

Vol. 33, No. 1.

January, 1941.

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

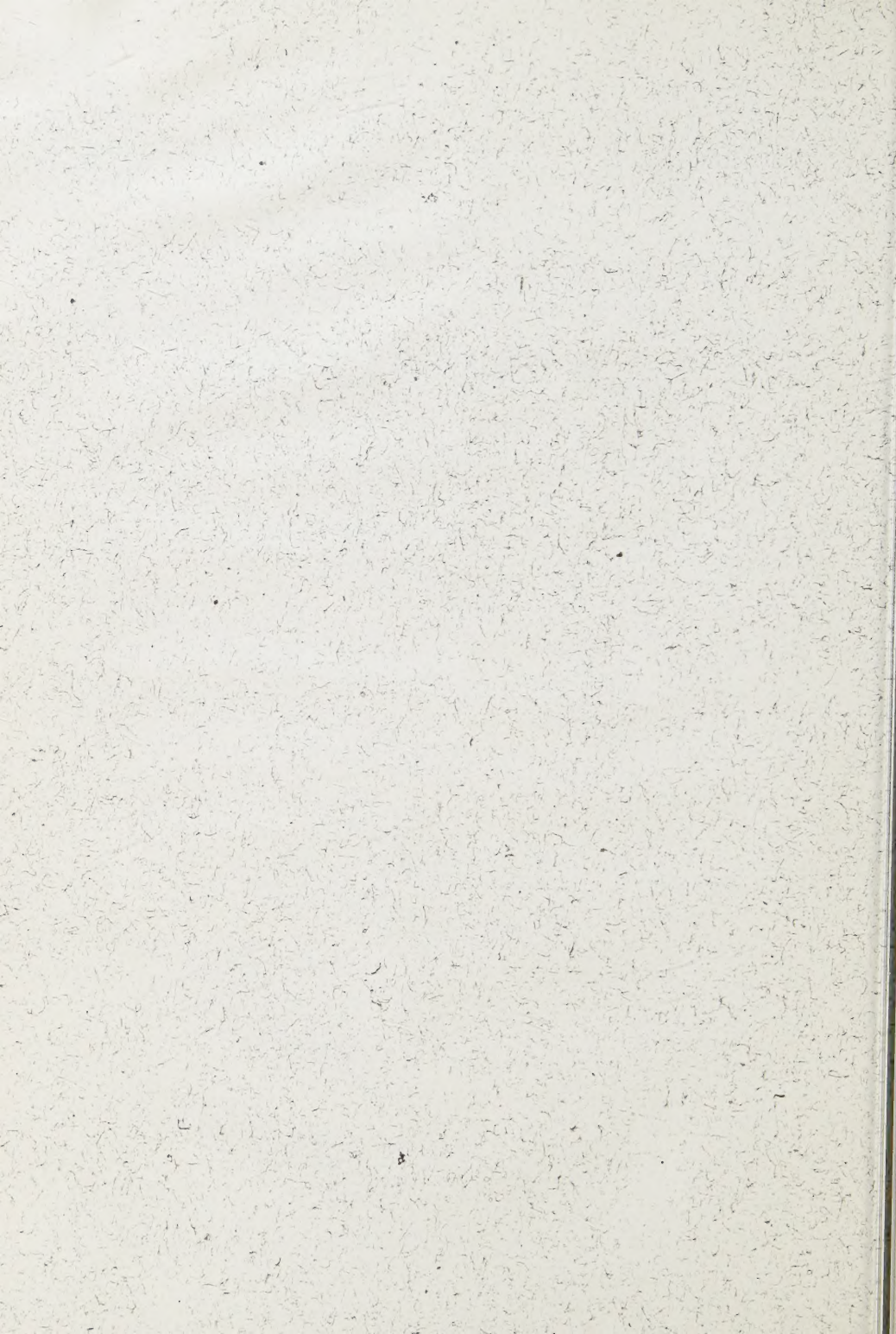
Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$6.00 per volume.



ON THE EFFECT OF AMINO-ACIDS AND PEPTIDES UPON SOME SURFACE ACTIVE SUBSTANCES.

By

YOSIO MUTÔ.

(From the Institute of Biochemistry, Tokio Imperial University,
Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, October 25, 1940)

I. INTRODUCTION.

The phenomenon that the surface tension of very dilute solutions of either acidic or basic surface active substances is quite feeble, and is greatly influenced by the addition of protein within a certain range of acidity, was studied by R. Sugino (1928, 1930) of this institute. Recently, surface chemistry of protein solutions and its monolayers was extensively studied by E. K. Rideal (1932), J. S. Mitchell (1937), A. H. Hughes (1935), J. H. Schulman (1938), H. Neurath (1936, 1938), E. Gorter (1937), and many others. It seems that protein molecules which are unfolded and adsorbed in the water surface are able to combine with other surface active molecules by their charged or bipolar radicals and in some cases by their long hydrocarbon chains.

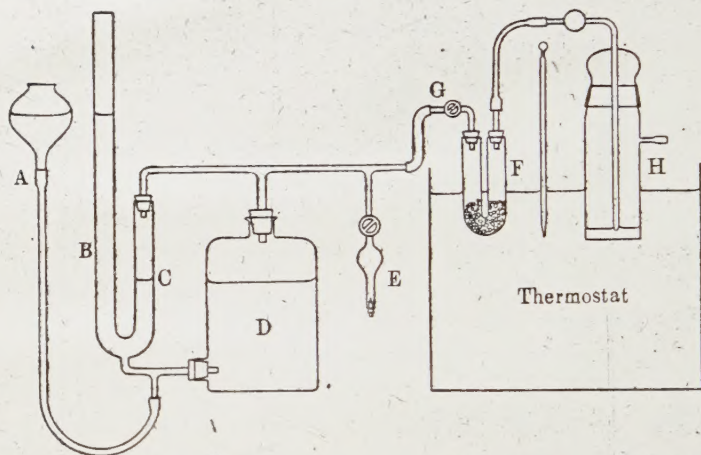
To understand this phenomenon it appears quite necessary to know the interaction between amino-acids or peptides and surface active acids of known constitution.

II. METHOD AND MATERIAL.

For the estimation of surface tension, the maximum bubble pressure method was used. The apparatus shown in Fig. 1. B C is a glass U-tube with a diameter of 2 cm. and is used as a water manometer. The pressure is read with a graduated mirror behind the tube. D is an air reservoir and E, an air inlet through which air is introduced into D after being filtered with a cotton plug. F is a U-tube filled with wet glass beads in order to supply moisture

to the air and so prevent vapourization through the bubble surface of the solution. H is a glass bottle with a diameter of about 5 cm., and with a glass stopper through which passes a glass tube, reaching about down to about 2 or 3 mm. above the bottom of the bottle, where the tube is fitted with a small opening of the diameter about 0.2 mm.

Fig. 1.



A definite amount of a solution to be tested is introduced by a pipette into the bottle sufficient to cover the opening of the inserted capillary. The cock G is opened and the bulb A is elevated slowly. The pressure where the bubble just remains at the opening and where even a small elevation causes its rupture is read. As only the determination of the lowering of the specific surface tension was desired, comparison with distilled water was sufficient. It was found convenient to maintain the room temperature a little over the thermostat temperature.

Capronic acid used was distilled from Merck's preparation and amino-benzoic acids were recrystallized using a little charcoal. ϵ -Leucine was prepared from cyclohexanone and hydroxylamine by Wallach's method. The hydrochloride was purified by dissolving it in a small quantity of alcohol and precipitating it with

the addition of about the same volume of ether. β -Naphthalene-sulphonic acid was prepared from its sodium salt and recrystallized several times.

Octyl sulphuric acid was prepared from normal primary octyl alcohol and purified as barium salt. The solution of this acid was prepared by adding the quantitative amount of sulphuric acid to the barium salt solution and filtering it through a clean filterpaper. When it was necessary the solution was evaporated and concentrated. Although a very little decomposition occurs in this case, it does not interfere as the alcohol liberated soon evaporates.

All other amino-acids and peptides were Merck's or Fränkel's preparations and were recrystallized from water or alcohol and ether.

pH was measured with quinhydrone electrode or colorimetrically.

III. EXPERIMENTAL RESULTS.

1. The case with capronic acid.

The result of the experiment with the mixture of *o*-amino benzoic acid and capronic acid is shown in Table I and II. Table I shows a lowering of the specific surface tension of solutions containing both solutes when the pH is adjusted to 2.8 by adding HCl. The concentration is shown in Mol per Litre.

TABLE I.

A lowering of specific surface tension of solutions containing capronic acid and *o*-amino benzoic acid at pH 2.8.

Conc. of Capronic acid	Conc. of <i>o</i> -amino benzoic acid		
	0	0.01	0.02
0	0	0.004	0.007
0.001	0.018	0.024	0.033
0.003	0.068	0.081	0.093
0.005	0.120	0.130	
0.010	0.215	0.224	

Table II shows the effect produced by the addition of *o*-amino benzoic acid and HCl to the solution of capronic acid with a concentration of 0.03 Mol.

TABLE II.
Lowering of specific surface tension with pH of 0.03 Mol solutions of capronic acid containing various amounts of *o*-amino benzoic acid and HCl.

Conc. of HCl	Conc. of <i>o</i> -amino benzoic acid					
	0		0.01		0.02	
	Surf. tens. low.	pH	Surf. tens. low.	pH	Surf. tens. low.	pH
0	0.063		0.081		0.096	
0.001	0.068	2.8				
0.002	0.069	2.5	0.081	2.8	0.093	2.8
0.004						
0.01	0.071	2.0	0.079	2.3	0.089	2.3
0.02			0.077	2.0		
0.03			0.076	1.7	0.080	1.9
0.04						

It is clear that in this case a lowering of the specific surface tension of solutions containing both solutes is slightly greater than the combined lowering of the surface tensions of solutions containing each of the solutes. On the contrary, when there is no chemical reaction between the solutes, the former is less than the latter.¹⁾ It is therefore conceivable to assume that there must have been slight chemical reactions between *o*-amino benzoic acid and capronic acid.²⁾

Such an increase of capillar activity was however not observed with *p*-amino-benzoic acid and with ϵ -leucine. With leucine, the result was similar to the same degree as with *o*-amino-benzoic acid.

As stated above, capronic acid and amino-acids have only slight

1) Cf. for example, J. A. V. Butler and C. Ockrent.

2) C. Wagner studied the surface tension of solutions containing phenol and anilin and concluded that more of the solute is absorbed at the surface when both solutes are contained in the solution; see the references.

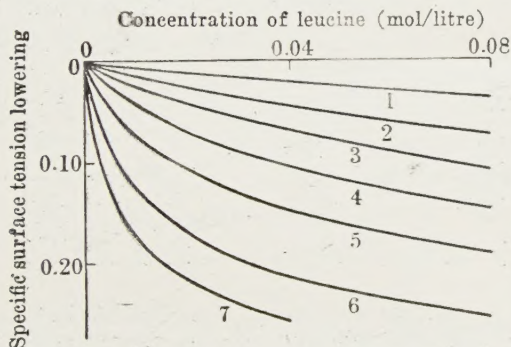
effect upon the surface activity of each other. But it is quite probable that such is due to the weakness of affinity between carboxyl groups and amino groups. I thus tried to use sulphonic acids instead of carboxylic acid.

2. The case with β -naphthalene-sulphonic acid.

Fig. 2 shows a lowering of the specific surface tension of solutions containing leucine and β -naphthalene-sulphonic acid. pH is kept between 1.2 and 1.4 by the addition of HCl. In the following figures, the ordinate shows a lowering of the surface tension and abscissa concentration of amino-acids. Higher concentrated solutions could not be used because of the appearance of crystalline precipitates.

Fig. 2.

Specific surface tension lowering of solutions containing β -naphthalene-sulphonic acid and leucine.



The numbers written under the curves denote

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| 1: without sulphonic acid | 5: with 0.0200 mol |
| 2: with 0.0025 mol | 6: with 0.0500 mol |
| 3: with 0.0050 mol | 7: with 0.1000 mol |
| 4: with 0.0100 mol | sulphonic acid. |

Fig. 3 shows the effect of changing pH. The concentration of sulphonic acid and of leucine is 0.02 Mol. A marked lowering of surface tension occurs between pH 4 and 2.

Fig. 4 shows the case of ϵ -leucine and sulphonic acid. As the capillary activity of ϵ -leucine is quite small the curve almost co-

Fig. 3.

Specific surface tension lowering of 0.02 molar solutions of β -naphthalene-sulphonic acid and leucine at various pH values.

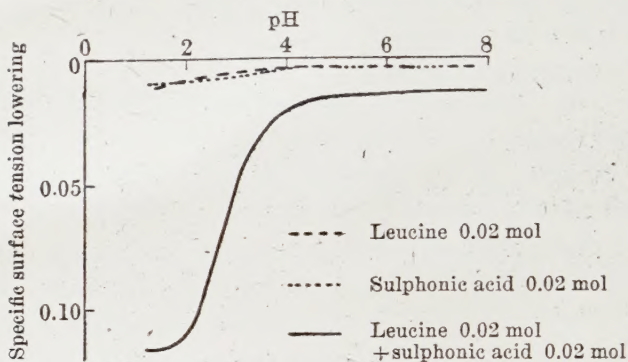
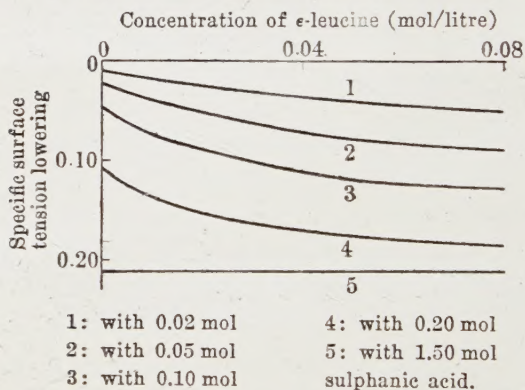


Fig. 4.

Specific surface tension lowering of solutions containing β -naphthalene-sulphonic acid and ϵ -leucine.



incides with the abscissa when no sulphonic acid is added. pH is between 1.2 and 1.4.

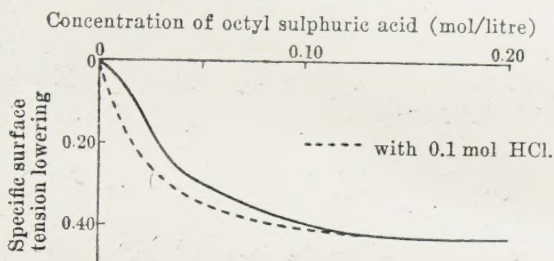
Purified arginine was kindly given by Dr. S. Shibuya to whom the author expresses his hearty thanks. This amino-acid is similar and less effective than ϵ -leucine.

3. The case with octyl sulphuric acid.

Fig. 5 shows the lowering of the surface tension of solutions of

Fig. 5.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid.



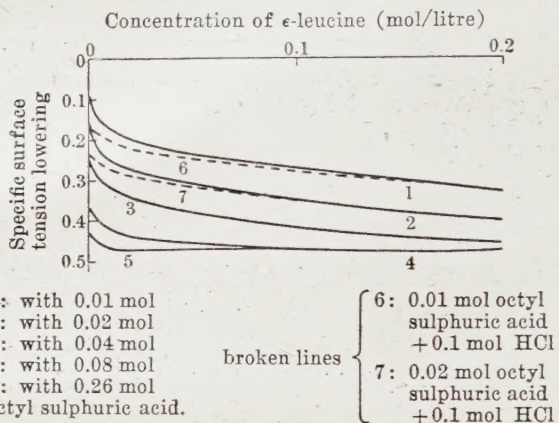
octyl sulphuric acid. The solid line indicates the solution of octyl sulphuric acid only and the broken line indicates the solution containing 0.1 Mol HCl besides octyl sulphuric acid. When hydrochloric acid is added, the surface tension is further decreased. Neutral electrolytes such as sodium chloride and barium chloride have also the same effect as HCl.¹⁾ Therefore, the phenomenon becomes complicated when amino-acid is added, but as mentioned below, amino-acids, though almost surface inactive, lower the surface tension of solutions of octyl sulphuric acid far more strongly than inorganic electrolytes. In the following experiment, amino-acids and peptides are added together as their hydrochlorides and pH is kept lower than 2. When the concentration of octyl sulphuric acid is low (about 0.01 Mol), pH becomes nearly 2, and when its concentration is high (about 0.1 or 0.2 Mol), pH is nearly 1. The solutions of low concentration of amino-acids with change in hydrogen ion concentration, affect the surface tension to a great extent. The solutions to which 0.1 or 0.05 Mol hydrochloric acid was added, were also examined in some cases. These results are shown by broken lines.

Fig. 4 shows the effect of ϵ -leucine. In this case with the increased concentration of octyl sulphuric acid and amino-acid, a lowering of the specific surface tension reaches a limiting value

1) Physical interpretation of such a phenomenon was studied by the present author theoretically; see Proc. Phys. Math. Soc. Jap., 20 (1938), 646-52.

Fig. 6.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and ϵ -leucine.



of about 0.46. The effect produced by the addition of 0.1 Mol hydrochloric acid to the 0.01 or 0.02 molar solution of octyl sulphuric acid is quite negligible when a large amount of ϵ -leucine is added.

Fig. 7.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and leucine.

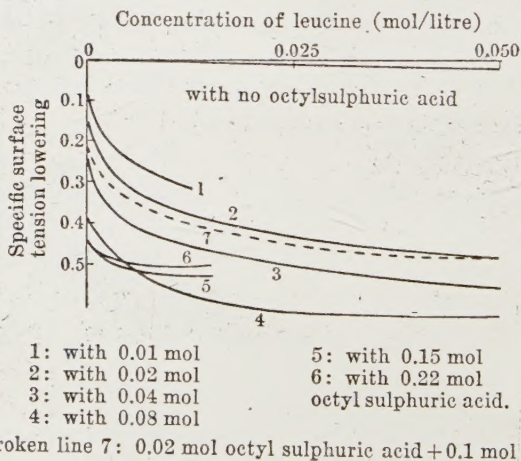


Fig. 7 shows the effect of α -leucine. While α -leucine is rather surface inactive, its addition lowers the surface tension of solutions of octyl sulphuric acid markedly. But as is the case with the curves 5 and 6, this effect becomes less when the concentration of octyl sulphuric acid becomes high.

Fig. 8, 9, 10 and 11 show the effect of isoleucine, phenylalanine, lysine, and tyrosine respectively. Lysine was used as dihydro-

Fig. 8.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and isoleucine.

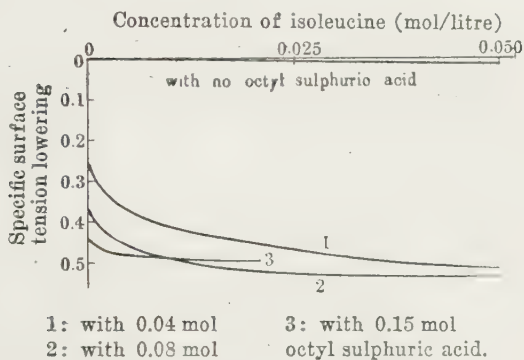


Fig. 9.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and phenylalanine.

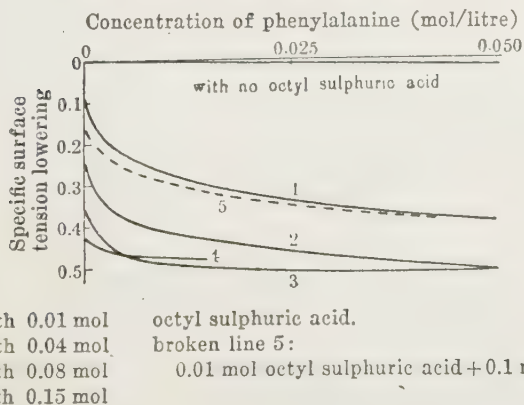


Fig. 10.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and lysine.

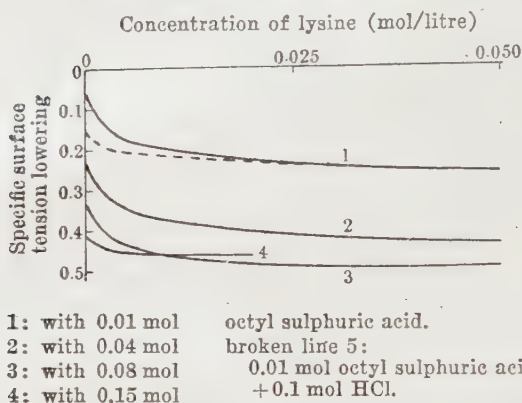
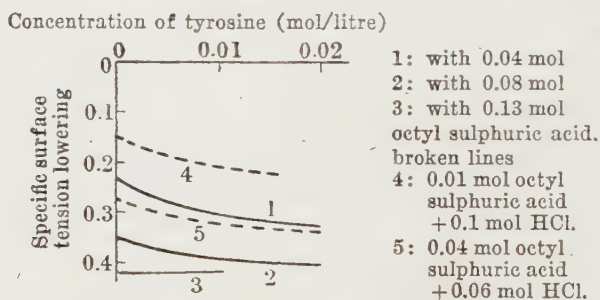


Fig. 11.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and tyrosine.



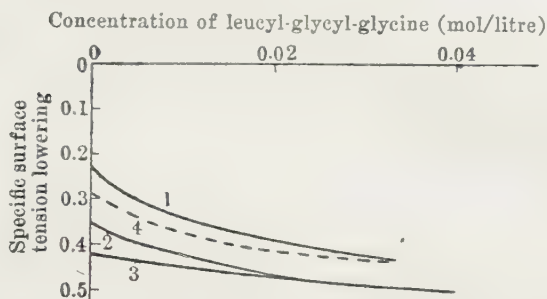
chloride. As tyrosine was quite insoluble, the measurement was inaccurate. Lysine and tyrosine themselves are almost surface inactive.

Fig. 12, 13 and 14 show the effect of leucyl-glycyl-glycine, leucyl-glycine and glycyl-leucine respectively.

For the convenience of comparing the effects of the various amino acids and peptides, a lowering of the surface tension of solutions containing various quantities of various amino acids or

Fig. 12.

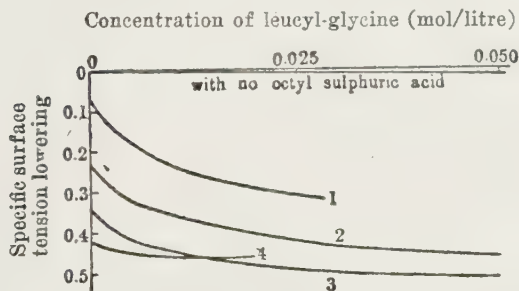
Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and leucyl-glycyl-glycine.



- 1: with 0.04 mol octyl sulphuric acid.
 2: with 0.08 mol octyl sulphuric acid.
 3: with 0.15 mol octyl sulphuric acid.
 broken line 4: 0.04 mol octyl sulphuric acid + 0.1 mol HCl.

Fig. 13.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and leucyl-glycine.



- 1: with 0.01 mol octyl sulphuric acid.
 2: with 0.04 mol octyl sulphuric acid.
 3: with 0.08 mol octyl sulphuric acid.
 4: with 0.15 mol octyl sulphuric acid.

peptides and a definite amount of octyl sulfuric acid is plotted in one figure. Fig. 15, 16 and 17 are the cases with 0.01, 0.04 and 0.08 molar solutions of octyl sulphuric acid respectively.

The effects of glycocoll, glycylglycine, prolylglycine anhydride,

Fig. 14.

Specific surface tension lowering of solutions containing octyl sulphuric acid and glycyl-leucine.

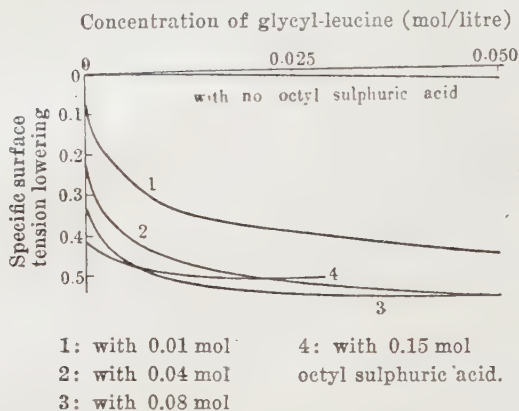
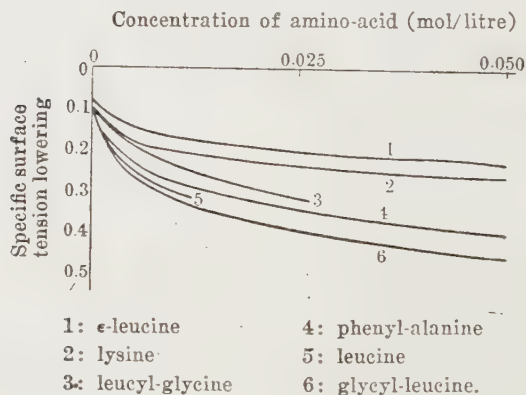


Fig. 15.

Specific surface tension lowering of 0.01 molar solutions of octyl sulphuric acid containing amino-acids or peptides.



and alanyl-glycine anhydride were also examined, but their effects were not remarkable. These diketo-piperazines were kindly given by Prof. T. Utino to whom the author wishes to express his hearty thanks.

Fig. 16.

Specific surface tension lowering of 0.04 molar solutions of octyl sulphuric acid containing amino-acids or peptides.

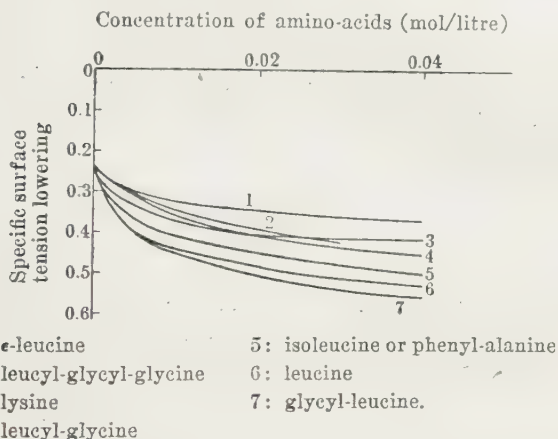
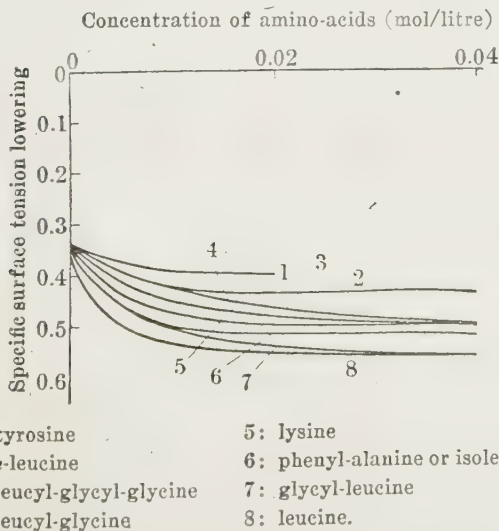


Fig. 17.

Specific surface tension lowering of 0.08 molar solutions of octyl sulphuric acid containing amino-acids or peptides.



IV. DISCUSSIONS.

Thus, it is conceivable that a definite reaction occurs between β -naphthalene-sulphonic acid or octyl sulphuric acid and amino-acids. Whether this reaction is so stable as to form a salt-like compound or is only due to electrostatic attraction between negatively charged $-\text{SO}_3$ or $-\text{SO}_4$ groups and positively charged $-\text{NH}_3$ groups of the adsorbed ions is left open for further investigations.

V. SUMMARY.

1. By the maximum bubble pressure method, the surface tension of solutions containing surface active organic acids and amino-acids was measured.

2. The lowering of surface tension of solutions containing capronic acid and *o*-aminobenzoic acid was slightly greater than the total sum of lowerings produced by each solution containing its respective solute.

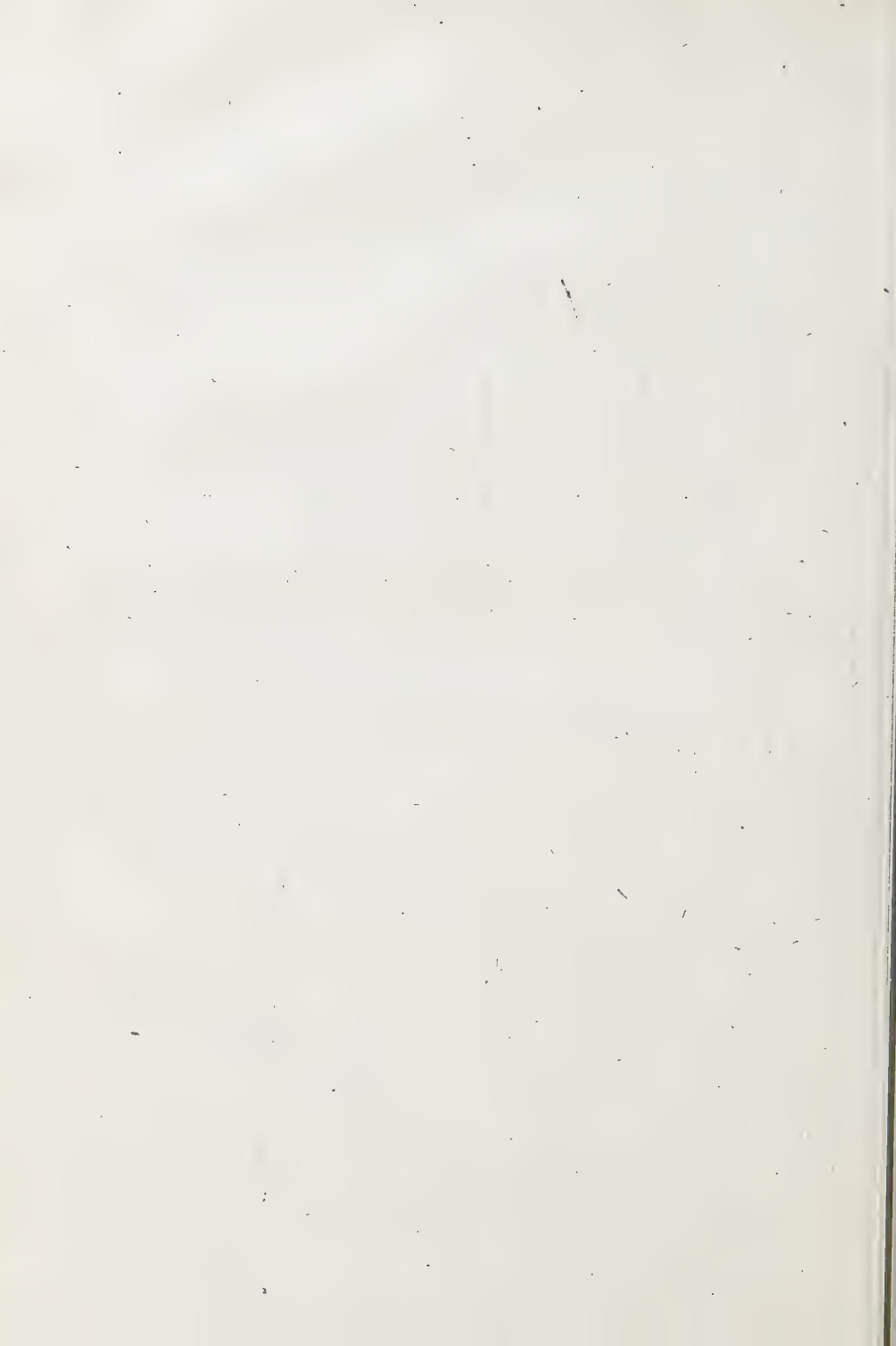
3. Surface tension of solutions containing β -naphthalene-sulphonic acid or octyl sulphuric acid is greatly lowered by adding a small amount of amino-acids or peptides which are only slightly surface active. But the addition of glycocoll, glycyl-glycine, etc. produced no or almost no such effect on surface tension.

The author wishes to express his hearty thanks to Prof. S. Kakiuchi for his kind advice throughout this investigation. The author also thanks Hattori Hôkôkwai very much for financial supports.

BIBLIOGRAPHY.

- Ackermann, T. (1934): Koll.-Z., **69**, 87-93.
Butler, J. A. V. and Ockrent, C. (1930): J. Phys. Chem., **34**, 2841-59.
Gorter, E. (1937): Tr. Farad. Soc., **33**, 1125-9.
Hughes, A. H. (1935): Bioch. J., **29**, 430-36.
Hughes, A. H. and Rideal, E. K. (1932): Proc. Roy. Soc. London, **A 137**, 62-77.
Johlin, J. M. (1930): J. Biol. Chem., **87**, 319-25.
Marsden, J. and Schulman, J. H. (1938): Tr. Farad. Soc., **34**, 748-58.
Mitchell, J. S. (1937): Tr. Farad. Soc., **33**, 1129-39.

- Mutô, Y. (1938): Proc. Phys. Math. Soc. Jap., **20**, 646-52.
- Neurath, H. (1936): J. Phys. Chem., **40**, 361-8.
- Neurath, H. (1938): J. Phys. Chem., **42**, 39-46.
- Rideal, E. K. (1932): Koll.-Z., **61**, 218-22.
- Schulman, J. H. (1937): Tr. Farad. Soc., **33**, 1116-25.
- Schulman, J. H. and Hughes, A. H. (1935): Bioch. J., **29**, 1239-42;
1243-52.
- Schulman, J. H. and Rideal, E. K. (1933): Bioch. J., **27**, 1581-97.
- Sugino, R. (1928): J. Bioch., **9**, 353-81.
- Sugino, R. (1930): J. Bioch., **11**, 31-45.
- Suzuki, R. (1935): J. Bioch., **21**, 153-71.
- Wagner, C. (1929): Z. Physik. Chem., **A 143**, 389-96.



ÜBER DIE TRYPTOPHANABSPALTUNG BEI DER EIWEISSVERDAUUNG.

VON

TÔGO SHIMADA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1940)

Es ist eine allgemeine Regel, dass Aminosäure bei ihrem Abbau in tierischen Organen zuerst oxydativ desaminiert wird. Das Reaktionsprodukt ist α -Ketosäure. Krebs(1933) hat es in schöner Weise unter Verwendung von Gewebsschnitten bewiesen. Eine sehr interessante Theorie des Aminosäureumsatzes wurde andererseits kürzlich von Braunstein(1937) aufgestellt. Sie ist die Umaminierungstheorie. Nach dieser Theorie reagiert die Aminosäure unter der Wirkung des Muskelferments mit der α -Ketoglutar-säure in solcher Weise, dass sich in der Versuchslösung α -Ketosäure und Glutaminsäure nachweisen lassen.

Es gibt aber einige Aminosäuren, die bei ihrem Umsatz zuerst vorwiegend an einer anderen chemischen Gruppe als der α -Amino-gruppe angegriffen werden. Dazu gehören die Argininspaltung durch Arginase und die Tyrosin oxydation durch Tyrosinase. Beide Reaktion sind der Hauptweg des normalen Abbaues der betreffenden Aminosäuren. Es wurde auch von Kotake(1937) festgestellt, dass Tryptophan an den Indolkern oxydiert und dann in Kynurenin überführt wird.

Bei der Untersuchung des Aminosäureabbaues wird meistens die Bestimmung der Spaltprodukte ausgeführt, z. B. Harnstoffbestimmung bei der Arginasewirkung. Dieser Argininabbau kann aber in einfacher Weise auch durch Ermittlung der zurückbleibenden Argininmenge untersucht werden. Iwabuchi(1936) hat Arginin als Flavianat gefällt und es dann in alkalischer Reaktion mittels Zinnchlorür reduziert. Den entstandenen Farbstoff hat er schliesslich zur Kolorimetrie verwendet.

Die Bestimmung des nicht angegriffenen Substrats ist besonders in solchen Fällen zweckmässig, wo der Abbaumodus noch nicht sicher bekannt ist. Histidin wird nach Edlbacher (1934) durch Leberferment unter Ammoniakbildung abgebaut. Er nimmt aber an, dass die fermentative Spaltung ausschliesslich an dem Imidazolring stattfindet und daher die α -Aminogruppe der Seitenkette immerhin intakt bleibt. Dagegen hat Sera (1938, 1940) aus dem Hydrolysat des Histidins Urocaninsäure und Isoglutamin isoliert und er hat weiter die Urocaninsäurebildung als die erste Reaktionsstufe des Histidinabbaues bezeichnet. Kurihara (1939) hat eine kolorimetrische Histidinbestimmung ausgearbeitet, die auf Knoop-scher Bromreaktion beruht. Bei dieser Methode kolorimetriert man das in alkalischer Reaktion in den blauen Farbstoff umgewandelte bromierte Produkt aus Histidin unter Stabilisierung der Verfärbung durch Cyanzusatz. Unter Gebrauch dieser Methode hat Takeuchi im hiesigen Institut den Histidinabbau untersucht und ein Ferment, Histidindesaminase, aus der Leber isoliert, das das Histidin fast quantitativ in Urocaninsäure überführen kann. Er hat dann die Urocaninsäurespaltung durch tierische Organe untersucht, wobei er zum Messen der Hydrolyse die Paulysche Diazoreaktion verwendet hat. Urocaninsäure wird schnell abgebaut. Unter der kombinierten Verwendung der Histidin- und Urocaninsäurebestimmung hat er den Versuch weiter ausgeführt und konnte ein zweites Ferment isolieren, das die Urocaninsäure spaltet, aber auf Histidin unwirksam ist. Darüber wird bei nächster Gelegenheit berichtet. In solcher Weise ist die Bestimmung des intakt bleibenden Substrats, falls das angewandte Verfahren auf einer spezifischen Reaktion des Substrats beruht, sowohl für die Trennung des Fermentgemisches als auch für die Isolierung der Spaltprodukte als sehr vorteilhaft zu erwähnen.

Ich habe eine kolorimetrische Methode der Tryptophanbestimmung studiert, die den Gehalt des freien Tryptophans einfach und in kurzer Zeit ermitteln lässt. Es gibt bekanntlich schon eine grosse Reihe von schönen Arbeiten aus dem Institut von Prof. Kotake über den Tryptophanabbau sowohl in vivo als auch in vitro. Ich habe daher unter Benutzung der neuen Methode die

Tryptophanabspaltung bei der Eiweissverdauung untersucht.

Zur Tryptophanbestimmung wurden bisher mehrere Methoden angegeben, aber die meisten beruhten auf der Kolorimetrie des Farbstoffes, der bei der Einwirkung von starker Säure auf das Gemisch von Tryptophan und Aldehyd entsteht. Als Aldehyd wurde Glyoxylsäure (Fasal, 1912; Felix, 1936), Formaldehyd (Fürth, 1924; Tillman, 1925; Komm, 1926; Masayama, 1936), p-Dimethylaminobenzaldehyd (Holm, 1923; Boyd, 1929), Benzaldehyd (Lüscher, 1922) oder Vanillin (Kraus-Ragins, 1925) gebraucht. Diese Farbenreaktionen fallen jedoch bekanntlich sowohl bei dem freien als auch bei dem gebundenen Tryptophan positiv aus.

Eine wässrige Tryptophanlösung färbt sich rot bei vorsichtigem Zusatz von Bromwasser. Diese Reaktion wurde bisher zum qualitativen Nachweis des Tryptophans sehr oft benutzt, weil sie nur dem freien Tryptophan spezifisch ist. Das gebundene Tryptophan sowohl in Eiweiss wie auch in Dipeptid reagiert nicht, wie es von Abderhalden und Kempe (1907) bewiesen wurde. Aber diese Bromreaktion ist bisher zur quantitativen Bestimmung des Tryptophans nicht angewendet worden. Bei meiner Kolorimetrie handelt es sich um diese Bromreaktion.

Es gibt wohl Bestimmungsmethoden des Tryptophans durch Bromzusatz, die von Levene und Rouiller (1907) und von Homer (1915) angegeben wurden. Bei der Methode von Levene und Rouiller (1907) fällt man Tryptophan mittels Quecksilbersulfats, zersetzt den Niederschlag durch Schwefelwasserstoff und titriert dann die mit Amylalkohol durchgemischte tryptophanhaltige Lösung mit Bromlösung, bis das von Amylalkohol aufgenommene rötliche Reaktionsprodukt entfärbt wird. Die Bromlösung ist vorher gegen eine reine Tryptophanlösung geeicht worden und man berechnet den Tryptophangehalt aus der verbrauchten Brommenge. Wie die Autoren selbst angegeben haben, wird die Bestimmung aber durch die Anwesenheit des Zystins komplizierter, das auch durch Quecksilbersulfat zusammen mit dem Tryptophan fällbar ist. Falls die zu untersuchende Lösung noch andere bromierbare Substanzen enthält, wird die Bestimmung dadurch

stark beeinträchtigt, weil der Tryptophangehalt aus dem Bromverbrauch berechnet wird. Die Methode von Homer (1915) benutzte den Bromverbrauch bei dem tiefgreifenden oxydativen Tryptophanabbau. Der Tryptophanlösung wird überschüssiges Brom zugesetzt, dann das zur Bromierung und Oxydation nicht gebrauchte Brom jodometrisch titriert und schliesslich der Tryptophangehalt aus dem vorher bemessenen Bromverbrauch der reinen Tryptophanlösung errechnet. Diese Methode wurde an dem Barythydrolysat des Eiweisses gebraucht und Homer hatte recht darin, dass er vor dem Bromierungsverfahren das zu bestimmende Tryptophan zuerst durch Quecksilbersulfat niederschlug und es weiter von den durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen befreite. Ob diese Methode allgemein zur Tryptophanbestimmung zu verwenden sei, steht dahin, weil die Versuchslösung ausser Tryptophan noch andere bromierbaren Substanzen enthalten kann, die sich gegen die oben erwähnten Fällungsmittel ebenso wie Tryptophan verhalten würden. Falls es sich bloss um die Bestimmung des gesamten Tryptophans nach vorangehender Alkalihydrolyse handelt, ist die Sache anders, weil die verschiedenen Messmethoden durch Säure-Aldehydreaktion dafür in noch einfacherer Weise ausführbar sind.

Die Ursache, warum die Bromreaktion des Tryptophans zur kolorimetrischen Bestimmung bisher nicht gebraucht wurde, beruht sicher darauf, dass der richtige Bromzusatz bis zur dem Tryptophangehalt entsprechenden rötlichen Verfärbung schwer zu kontrollieren ist, weil die Tryptophanlösung bei jedem Eintropfen des Bromwassers allmählich rötlicher wird, aber beim Überschreiten der Bromierung jene rote Verfärbung unter allmählicher Nuanceänderung sich zur gelben verwandelt, darum die maximale Bildung der roten Substanz unvermeidlich übersehen wird.

Die beim Bromieren des Tryptophans entstehende rote Substanz ist in Wasser schwerlöslich, die Farbenvergleiche in wässrigem Medium ist daher zur quantitativen Bestimmung des Tryptophans nicht geeignet. Jene rote Substanz wird aber in Chloroform durch die gleichzeitige Anwesenheit von Trichloressigsäure und Essigsäure löslich gemacht; deshalb wird unter solcher

Bedingung das in wässriger Lösung vorhandene Tryptophan je nach dem Fortschreiten des Bromierens immer als rote Substanz durch Chloroform aufgenommen. Jener Zusatz der Trichloressigsäure wurde eigentlich mit Rücksicht auf das vorherige Enteiweissen der Versuchslösung probiert und erwies sich später als unbedingt nötig zum Überführen des Farbstoffes in die Chloroformschicht.

Um den Bromzusatz bei der maximalen rötlichen Verfärbung zu unterbrechen, wählte ich Methylorange als Indikator. Dieser Farbstoff löst sich in Chloroform nicht und wird durch Brom oxydativ entfärbt. Indigocarmin ist auch brauchbar zur Erkennung der Endreaktion des Bromierens, wobei die blaue Farbe des Indikators auch oxydativ entfärbt wird, aber nach meiner Erfahrung ist dieser Farbstoff bei vorliegendem Fall weniger passend als Methylorange. Es gibt vielleicht noch bessere Indikatoren als Methylorange, ich habe sie aber nicht weiter untersucht.

Die erforderlichen Reagenzien zur Bestimmung des freien Tryptophans und das Ausführungsverfahren selbst werden weiter unten angegeben.

Erforderliche Reagenzien:

1. Chloroform.
2. Eisessig.
3. 16% wässrige Trichloressigsäure.
4. Indikator: Methylorange, 0,01% wässrige Lösung.
5. Essig-Brom Lösung I (1,5% Brom in 33% Essigsäure).
6. Essig-Brom Lösung II (0,3% Brom in 33% Essigsäure).
7. 10% Essigsäure in Chloroform.

Erforderliche Apparate:

1. Kolorimeter.
2. 10 ccm Messzylinder mit Glasstöpsel.
3. Kleine zylindrische Scheidentrichter von ungefähr 15 ccm Inhalt mit Glasstöpsel.

Ausführung: Die tryptophanhaltige Versuchslösung wird mit gleicher Menge 16% Trichloressigsäure gemischt und filtriert. Andererseits werden in den Scheidentrichter 4 ccm Chloroform und

1 ccm Eisessig genommen und gut gemischt. Dazu werden 2,0 ccm vom obenerwähnten Filtrat einpipettiert, mit 2 gtt. Methylorange versetzt, dann aus der Bürette die Essig-Brom Lösung I eingetropft und der Inhalt des Scheidentrichters von Zeit zu Zeit vorsichtig gemischt. Je nachdem die Bromierung fortschreitet, geht der entstandene rote Bromkörper in die Chloroformschicht über, während sich das Methylorange in der wässrigen Schicht allmählich entfärbt. Es ist dabei günstig, dass das Chloroform dem Dichteverhältnis gemäss unter der wässrigen Schicht liegt und infolgedessen die Überoxydation des gebildeten roten Körpers durch die eintropfende Bromlösung auf das geringste Mass beschränkt werden kann. In diesem Punkt übertrifft das Chloroform die anderen den roten Bromkörper auflösenden Lösungsmittel. Wenn Methylorange in der wässrigen Schicht sich beinahe entfärbt, wird noch 1 gtt. Indikator zugesetzt, dann die Essig-Brom Lösung II eingetropft, bis die rötliche Farbe von Methylorange in der wässrigen Schicht gänzlich verschwindet. Die Endreaktion ist ziemlich deutlich. Der Scheidentrichter wird hierauf stark geschüttelt, die Chloroformschicht in den 10 ccm Messzylinder ausgegossen, 1 ccm von neuem Chloroform zum Inhalt des Scheidentrichters zugefügt, um den zurückbleibenden roten Körper quantitativ aufzunehmen, und dann wird auch das Chloroform in den Messzylinder übertragen. Alsdann wird der Inhalt des Zylinders mit Essigsäure-Chloroformlösung bis zur 10 ccm Marklinie gefüllt. Die vorherige Eisessigzufügung zum Chloroform als Auffüllungsmittel hat den Zweck, dem sonst unvermeidlichen Trüben der rötlichen Chloroformlösung vorzubeugen. Nun wird der Messzylinder gut umgeschüttelt, 15–20 minutenlang bei 37° im Brutschrank stehen gelassen. Dann ist die Lösung fertig zur Kolorimetrie. Als Vergleichslösung dient die in ganz gleicher Weise wie oben behandelte reine Tryptophanlösung von bekannter Konzentration. Unter Gebrauch des gewöhnlichen Dubosq-Kolorimeters kann man den Tryptophangehalt in 1 ccm von $M/40$ – $M/400$ Konzentration, also 5,1–0,51 mg Tryptophan, innerhalb von etwa 3% Abweichung bestimmen. Weiter wurde bestätigt, dass sich auch das dem Pepton oder Organbrei zugesetzte Tryptophan quantitativ wieder nachweisen lässt.

Über den Bromverbrauch bei der Tryptophanreaktion ist schon eine ausführliche Untersuchung von Neuberg (1907) vorhanden. Er hat wässrigen Tryptophanlösungen verschiedene Mengen einer Brom-Bromkalilösung zugesetzt und die stärkste rotviolette Verfärbung in solchen Fällen gefunden, bei denen 4 Atome Brom auf 1 Molekül Tryptophan reagierten. Bei der vorliegenden Bestimmungsmethode wurde wohl eigentlich die dem Tryptophangehalt entsprechende Vertiefung der roten Verfärbung gewünscht, jedoch hinsichtlich des Zweckes der Ausarbeitung der Mikromethode war ausserdem die maximale Bildung des roten Farbstoffes vorteilhaft, Ich habe daher bei der Ausführung der Bestimmungen einer bekannten Tryptophanmenge jene Bromlösungsmenge, die bis zum Entfärben des in der wässrigen Schicht vorhandenen Indikators, der Methylorange zuzusetzen war, gemessen und den Bromgehalt in den betreffenden Mengen der Essig-Bromlösung jodometrisch bestimmt. Es war genau in dem Verhältnis vorhanden, dass 4 Atome Brom auf 1 Molekül Tryptophan reagierten.

Die hier angegebene kolorimetrische Methode bestimmt das freie Tryptophan, während die bisher von vielen Autoren mitgeteilten Verfahren hauptsächlich auf der Indolreaktion beruhend ausgearbeitet wurden, infolgedessen dadurch mit dem freien Tryptophan zusammen auch das gebundene gemessen wurde. Die Bestimmung des gesamten Tryptophans, sowohl des freien als auch des gebundenen, ist an sich manchmal wohl wünschenswert, es gibt jedoch sicher ein weiteres Versuchsgebiet, bei dem die Bestimmung des freien, nicht gebundenen Tryptophans vorgezogen wird.

Mit dieser Methode habe ich nun die Tryptophanabspaltung bei der Eiweissverdauung untersucht.

Ich habe auf Kasein und Wittepepton proteolytische Fermente einwirken lassen und die Zunahme des Aminostickstoffes und des freien Tryptophans gemessen. Die gebrauchten Fermente waren Pepsin (Sankyo), Trypsin (Grübler) und Dünndarmextrakt als Erepsin. Die beiden letzteren sind enzymologisch nicht einheitlich und enthalten verschiedene Protease und Acylase. Aber da sowohl das peptische Kaseinhydrolysat als auch Pepton-Witte nichts anderes als das Gemisch verschiedener Polypeptide sind, und da

meines Erachtens der Gebrauch des isolierten Ferments zur Hydrolyse des so komplizierten Gemisches nicht besonders wertvoll ist, habe ich die Versuche einfach mit Magen-, Pankreas- und Darmsaftprotease ausgeführt. Die Reihenfolge der Fermentwirkung war für Kasein so geordnet: Pepsin-Trypsin-Erepsin, Pepsin-Erepsin und Trypsin-Erepsin, und für Peptonwitte: Trypsin-Erepsin.

Die Resultate der Experimente werden in Figuren angegeben. An der Abszisse sind die Verdauungstage und an der Ordinate die Zunahme des Aminostickstoffes und das gemessene freie Tryptophan in mg gezeigt. Diese Zahlenwerte werden auf 0,1 g Kasein und Pepton umgerechnet.

Man kann aus diesen Ergebnissen folgendes ersehen:

Bei der peptischen Verdauung des Kaseins wird kein Tryptophan abgespalten. Wenn Trypsin bei $\text{pH } 8$ auf das peptische Hydrolysat wirkt, wird eine schnelle Abspaltung des Tryptophans beobachtet. Bei der darauf folgenden Erepsinwirkung vermehrt sich zwar Aminostickstoff, aber nicht Tryptophan. Dieses stimmt mit der Angabe von Kraus-Ragins (1928) überein.

Wenn das Erepsin gleich nach der Pepsinverdauung einwirkt, wird auch eine Tryptophanabspaltung beobachtet, aber ihre Menge reicht kaum bis zur Hälfte des Trypsinversuchs.

Bei der direkten Trypsinwirkung auf Kasein wird eine reichliche Menge Tryptophan abgespalten. Die nachfolgende Erepsinwirkung ergibt Aminostickstoffzunahme, aber keine weitere Tryptophanabspaltung. Die Tryptophanmenge bei der direkten tryptischen Wirkung ist grösser als bei jenem Fall, bei dem die Pepsinwirkung vorangeht. Man kann sagen, dass für die präparative Tryptophanherstellung aus Kasein die einfache tryptische Verdauung, die bisher wie üblich angewandt wurde, schon hinreichend und auch zweckmässig ist.

Witte-Pepton enthält kein freies Tryptophan. Lässt man Trypsin auf dieses einwirken, wird freies Tryptophan gebildet. Die darauf folgende Erepsinwirkung zeigt bei diesem Fall aber eine deutliche Abspaltung des Tryptophans. Witte-Pepton ist ein

Präparat aus Fleischeiweiss. Die Tryptophanabspaltung aus dem peptisch-tryptischen Hydrolysat ist also nach Eiweissarten verschieden.

Man kann bestimmt sagen, dass das Pepsin keine Tryptophanabspaltung aus Eiweiss bewirkt. Kraus-Ragins (1928) hat eine Spur des freien Tryptophans im peptischen Hydrolysat des Kaseins, Edestins und Cucurbitaceensamenglobulins gefunden. Es ist möglich, wie von ihr angegeben, dass dieses nach der Vanillin-HCl Methode bemessene Tryptophan mit dem abgebauten Eiweisssubstrat nichts zu tun hat und von dem teilweise selbstverdauten Pepsin her stammt. Der Befund von demselben Autor, dass das freie Tryptophan schon im Witte-Pepton enthalten ist, zeigt bloss die Anwesenheit des durch Quecksilbersulfat fällbaren gebundenen Tryptophans in dem Peptonpräparat. Es ist eine allgemeine Annahme, dass das Pepsin überhaupt keine Abspaltung der freien Aminosäure bewirkt. Anwesenheit des Arginins in dem peptischen Hydrolysat wurde oft mitgeteilt. Solche Ergebnisse zeigen nur, dass in dem Hydrolysat die durch die Arginase angreifbaren Substanzen vorhanden sind, aber nicht unbedingt, dass das freie Arginin darin gebildet worden ist, weil es im Leberextrakt ein Ferment gibt, das aus dem gebundenen Arginin und den Argininderivaten Harnstoff zu erzeugen imstande ist, obwohl die Harnstoffbildung durch dieses Ferment im allgemeinen schwächer ist als die Spaltung des natürlichen Arginins durch die in demselben Extrakt vorhandene eigentliche Arginase. Wenn andererseits die von manchen Autoren gebrauchte Leberarginase mit der Polypeptidase vermischt worden sei und wenn diese Protease während des Versuchs zur Argininbestimmung auf das peptische Eiweissabbauprodukt einwirkte, um daraus das sogenannte reaktive Arginin zu liefern, ist die ganze Sache sehr einfach. Über dieses Problem wird bei nächster Gelegenheit aus hiesigem Institut berichtet werden.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die Herrn Professor Akamatsu zur Förderung der wissenschaftlichen

Forschungen von dem Unterrichtsministerium zur Verfügung gestellt wurde.

Abb. 1.

Kasein.

Pepsin-Trypsin-Erepsin

Pepsin-Erepsin

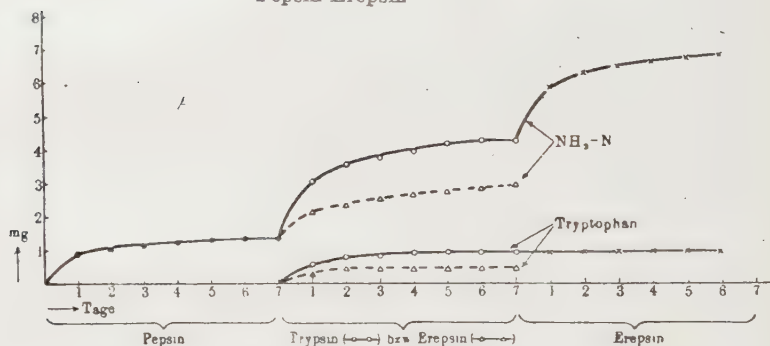


Abb. 2.

Kasein.

Trypsin-Erepsin

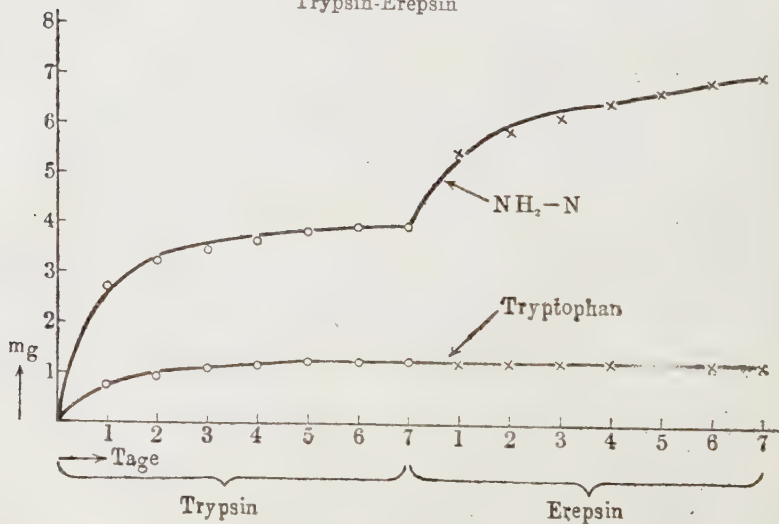
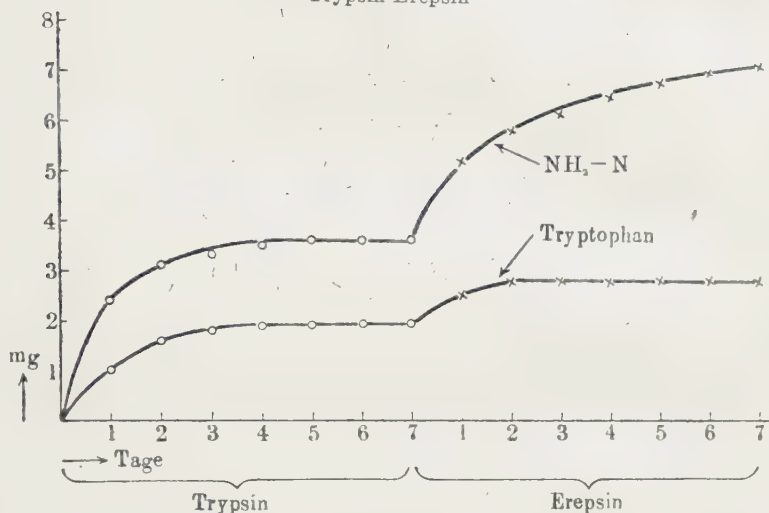


Abb. 3.
Pepton.
Trypsin-Erepsin



EXPERIMENTELLER TEIL.

1. Quantitative Bestimmung des Tryptophans in seiner wässrigen Lösung.

Je 1 ccm Tryptophanlösung von verschiedener Konzentration wird in oben beschriebener Weise mit 1 ccm 16% Trichloressigsäure versetzt und bromiert. Als Standardlösung dient die *M*/100 Tryptophanlösung—1 ccm davon enthält 2,041 mg Tryptophan—und der Tryptophangehalt in anderen Lösungen wird kolorimetrisch gemessen.

TABELLE I.

Konzentration des Tryptophans	1 ccm enthält		
	ber.	gef.	%
<i>M</i> /40	5,103 mg	5,040 mg	99
<i>M</i> /100	2,041 "	2,041 "	100
<i>M</i> /150	1,361 "	1,361 "	100
<i>M</i> /200	1,021 "	1,008 "	98
<i>M</i> /400	0,510 "	0,498 "	98

2. Bestimmung des zur Peptonlösung zugesetzten Tryptophans.

5,0 ccm 1% Pepton-Witte + 5,0 ccm M/50 Tryptophan. Die Endkonzentration des Tryptophans ist M/100. Als Kontrolle dient 0,5% Peptonlösung. 2 ccm beider Lösungen werden je mit gleicher Menge Trichloressigsäure versetzt und 2 ccm klares Filtrat zum Versuch gebraucht. Die Vergleichslösung wird aus 1 ccm M/100 Tryptophanlösung bereitet. Die Kontrolle-Peptonlösung ohne Tryptophanzusatz ergibt, dass kein freies Tryptophan darin präformiert vorhanden ist. In 1 ccm tryptophanhaltiger Peptonlösung wird 2,024 mg Tryptophan, also 99% der berechneten Menge, wiedergefunden.

3. Bestimmung des zum Organbrei zugesetztem Tryptophans.

Frische Rattenleber wird zerrieben und in 4 fachem Volumen Wasser suspendiert. Die folgenden Gemische werden bereitet und schnell durch Zusatz mit gleichem Volumen Trichloressigsäure enteiweisst. 1) 2,0 ccm Lebersuspension + 4,0 ccm M/40 Tryptophan + 4,0 ccm Phosphatpuffer; 2) 2,0 ccm Suspension + 4,0 ccm Wasser + 4,0 ccm Puffer. Die Enteiweissung wird beschleunigt, weil sonst allmählich Schwund des freien Tryptophans durch das im Organbrei vorhandene Ferment stattfindet. In der einfachen Lebersuspension war kein freies Tryptophan messbar. In 1 ccm Lebersuspension, der Tryptophan zugesetzt wurde, wird 2,062 mg Tryptophan nachgewiesen; es macht 101% der zugesetzten Menge.

4. Die verbrauchte Brommenge zur Bildung des roten Bromkörpers.

Zuerst werden die Reagenzien und 1.0 ccm M/40 Tryptophan in den Scheidentrichter genommen und unter Ausführung des Bestimmungsverfahrens wird in üblicher Weise die eben bis zum Entfärben des Indikators verbrauchte Menge der Brom I Lösung und Brom II Lösung gemessen. Dann wird genau dieselbe Menge der Brom I Lösung und Brom II Lösung in einen 100 ccm Erlenmeyer Kolben genommen, der 1 ccm Eisessig, 1 ccm 16%

Trichloressigsäure um eine bestimmte Menge Jodkalilösung enthält. Das freigemachte Jod wird unter Stärkezeusatz mit Natrium Thiosulfat aus einer Mikrobürette titriert.

	Brom I Lösung	Brom II Lösung	N/10 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Versuch a	1,00 ccm	0,99 ccm	1,03 ccm
Versuch b	1,00 "	1,12 "	1,07 "
Versuch c	1,00 "	0,89 "	0,99 "

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass unter unserer Versuchsbedingung 1 ccm $M/10$ Brom für 1,0 ccm $M/40$ Tryptophan verbraucht wird; nämlich dass zur Bildung der dem Tryptophangehalt entsprechenden Menge des roten Bromkörpers ein Molekül Tryptophan genau 4 Atome Brom aufnimmt.

5. Die quantitative Bestimmung des abgespaltenen Tryptophans bei der Verdauung des Eiweisses.

Die gebrauchten Substrate sind Kasein-Merek und Witte Pepton. Als proteolytisches Ferment wurden Pepsin von Sankyo, Trypsin von Grübler und Darmschleimhautextrakt als Erepsin gebraucht. Die Erepsinlösung wurde wie folgt hergestellt: Schweindarmschleimhaut wurde übernacht mit 5 fachen 87% Glycerin extrahiert, der Auszug 30 Minuten auf 55° erwärmt und zentrifugiert, die überstehende Lösung mit Essigsäure auf pH 4,6 angesäuert und Wasser zugesetzt, um den Glycerinextrakt endlich anderthalbfach zu verdünnen, dann die Lösung nochmals zentrifugiert und die überstehende Lösung mit Ammoniak neutralisiert. Das ganze Experiment hindurch ist die Versuchstemperatur der Fermentwirkung 37° . Das pH wurde an der Versuchslösung mittels des Indikatorpapiers gemessen. Die proteolytischen Versuche wurden wie folgt angesetzt.

60 g Kasein werden zuerst mit Wasser, dann mit Salzsäure versetzt, bis die erhaltene Lösung pH 2 wird. Man verdünnt die Lösung weiter mit Wasser auf 300 ccm und löst nun darin 6 g Pepsin auf (20% Kaseinlösung). Die Zunahme des Amino-N wird nach Van Slyke und die abgespaltene Tryptophanmenge kolorimetrisch alle 24 Stunden bestimmt.

Nach 7 Tagen wird die letzte Messung der Aminostickstoff-

zunahme und der Tryptophäuspaltung an dem peptischen Hydrolysat ausgeführt; je 120 ccm Hydrolysat werden weiter der Trypsin- bzw. Erepsinverdauung überlassen. Beim ersteren Fall macht man die Lösung durch Zusatz von A ccm *N*-Natronlauge zu PH 8 und versetzt dann mit 40-A ccm Wasser und dann mit 2 g Trypsin (15% Kaseinlösung). Beim letzteren Fall werden zu dem ebenso mit A ccm *N*-Natronlauge und 60-A ccm Wasser versetzten Hydrolysat (PH 8) 60 ccm Erepsinlösung hinzugefügt (10% Kaseinlösung). Bei beiden Fällen werden die Aminostickstoffzunahme und die abgespaltene Tryptophanmenge wie beim Pepsinhydrolysat gemessen. Das peptisch-tryptische Hydrolysat wird weiter durch Erepsin verdaut, indem man 40 ccm davon mit 20 ccm Erepsinlösung versetzt, wobei das PH der Lösung nicht merklich verschoben wird.

Bei direkter Trypsinwirkung auf Kasein ist das Verfahren prinzipiell dasselbe wie bei der Pepsinverdauung; 15 g Kasein werden mit Wasser und dann mit *N*-Natronlauge versetzt, bis die Lösung PH 8 wird, weiter verdünnt man die Lösung mit Wasser auf 100 ccm und löst dann darin 1,5 g Trypsin auf (15% Kaseinlösung). Nach 7 Tagen wird weiter das tryptische Hydrolysat, ebenso wie das peptisch-tryptische Hydrolysat oben behandelt wurde, durch Erepsin verdaut.

Einwirkung des Trypsins und des Erepsins auf Witte Pepton geschieht in ganz gleicher Weise wie bei Kasein.

Die Aminostickstoffmessung wird bei jedem Versuch an 1,0 ccm Hydrolysat nach Van Slyke ausgeführt. Bei der Bestimmung der abgespaltenen Tryptophanmenge werden 2,0–3,0 ccm Hydrolysat verwendet, dazu die gleiche Menge 16% Trichloressigsäure zugefügt und dann 2,0 ccm Filtrat zur kolorimetrischen Bestimmung gebraucht. Während des ganzen Experimentes wird der Kontrollversuch parallel ohne Substratzusatz durchgeführt, um die Aminostickstoff- und Tryptophanmenge des Hauptversuchs damit zu korrigieren. Bei diesem Kontrollversuch wird wohl eine Aminostickstoffzunahme wegen der Selbstverdauung der proteolytischen Fermente bemerkt, doch keine messbare Abspaltung des Tryptophans gefunden.

Um die obigen Resultate durch den ganzen Verlauf des Experiments klar ersichtlich zu machen, werden in den folgenden Tabellen die bemessenen Werte weiter für 1,0 ccm 10% Lösung von Kasein bzw. Pepton (0,1 g Kasein oder Pepton) umgerechnet.

TABELLE II.

A. Kasein.

a) Pepsin-Trypsin-Erepsin.

Protease	Wirkungsdauer	NH ₂ -N Zunahme	Tryptophan
Pepsin	1 Tag	0,90 mg	0 mg
	2 Tage	1,00 "	0 "
	3 "	1,08 "	0 "
	4 "	1,19 "	0 "
	5 "	1,31 "	0 "
	6 "	1,33 "	0 "
	7 "	1,32 "	0 "
Trypsin	1 Tag	2,97 "	0,56 "
	2 Tage	3,49 "	0,76 "
	3 "	3,68 "	0,82 "
	4 "	3,91 "	0,88 "
	5 "	4,15 "	0,91 "
	6 "	4,21 "	0,93 "
	7 "	4,23 "	0,93 "
Erepsin	1 Tag	5,77 "	0,93 "
	2 Tage	6,18 "	0,93 "
	3 "	6,38 "	0,95 "
	4 "	6,48 "	0,95 "
	5 "	6,57 "	0,93 "
	6 "	6,69 "	0,92 "

b) Pepsin-Erepsin.

Dasselbe peptische Hydrolysat wie beim Versuch a wird ohne die vorangehende Trypsineinwirkung durch Erepsin verdaut.

Protease	Wirkungsdauer	NH ₂ -N Zunahme	Tryptophan
Erepsin	1 Tag	2,10 mg	0,28 mg
	2 Tage	2,28 "	0,38 "
	3 "	2,46 "	0,39 "
	4 "	2,56 "	0,39 "
	5 "	2,71 "	0,40 "
	6 "	2,77 "	0,41 "
	7 "	2,88 "	0,41 "

e) Trypsin-Erepsin.

Protease	Wirkungsdauer	NH ₂ -N Zunahme	Tryptophan
Trypsin	1 Tag	2,73 mg	0,76 mg
	2 Tage	3,19 "	0,91 "
	3 "	3,38 "	1,05 "
	4 "	3,59 "	1,13 "
	5 "	3,78 "	1,20 "
	6 "	3,86 "	1,20 "
	7 "	3,87 "	1,20 "
Erepsin	1 Tag	5,46 "	1,20 "
	2 Tage	5,84 "	1,20 "
	3 "	6,08 "	1,20 "
	4 "	6,40 "	1,20 "
	5 "	6,64 "	1,20 "
	6 "	6,81 "	1,20 "
	7 "	6,94 "	1,20 "

B. Witte-Pepton.

Trypsin-Erepsin.

Protease	Wirkungsdauer	NH ₂ -N Zunahme	Tryptophan
Trypsin	1 Tag	2,41 mg	1,05 mg
	2 Tage	3,12 "	1,64 "
	3 "	3,27 "	1,80 "
	4 "	3,50 "	1,94 "
	5 "	3,60 "	1,94 "
	6 "	3,63 "	1,96 "
	7 "	3,63 "	1,94 "
Erepsin	1 Tag	5,23 "	2,55 "
	2 Tage	5,77 "	2,83 "
	3 "	6,13 "	2,83 "
	4 "	6,54 "	2,80 "
	5 "	6,85 "	2,80 "
	6 "	7,03 "	2,83 "
	7 "	7,16 "	2,83 "

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des Tryptophans ausgearbeitet. Sie beruht auf der Bromreaktion, die für freies Tryptophan spezifisch ist. Der während des Bromzusatzes gebildete rötliche Körper wird bei Anwesenheit von Essigsäure und Trichloressigsäure von dem untergeschichteten Chloroform aufgenommen. Die Endreaktion der Bromierung wird durch Entfärben des Methylorange anerkannt. Die bis zum Entfärben dieses Indikators verbrauchte Brommenge steht mit der zu bestimmenden Tryptophanmenge in solchem Verhältnis, dass 4 Atome Brom auf 1 Molekül Tryptophan reagieren. Die Bestimmung wird an der Chloroformlösung des gebildeten rötlichen Körpers mittels Dubosqschen Kolorimeters ausgeführt. 5,1–0,51 mg Tryptophan ist mit zufriedenstellender Genauigkeit bestimmbar und das dem Organbrei oder Pepton zugesetzte Tryptophan kann quantitativ wieder nachgewiesen werden.

Unter Gebrauch dieser Methode wurde die Tryptophanabspaltung bei der Eiweissverdauung untersucht. Die peptische Verdauung des Kaseins liefert kein freies Tryptophan. Auch Pepton-Witte enthält kein freies Tryptophan. Trypsin macht aus dem peptischen Kaseinhydrolysat eine reichliche Tryptophanmenge frei. Es wurde mit Sicherheit festgestellt, dass zur präparativen Darstellung des Tryptophans aus Kasein die einfache tryptische Verdauung schon hinreichend ist.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Kempe, M. (1907): Ber. d. deutsch. chem. Ges., 40, 2737.
Boyd, W. J. (1929): Biochem. J., 23, 78.
Braunstein, A. E. u. Kritzmann, M. M. (1937): Biochem., 2, 242; Chem. Zbl. 1937, II, 3775.
Edlbacher, S. u. Neber, M. (1934): Z. f. physiol. Chem., 224, 261.
Fasal, H. (1912): Biochem. Z., 44, 392.
Felix, K., Baumer, L. u. Schörner, E. (1936): Z. f. physiol. Chem., 243, 52.
Fürth, O. u. Disch, Z. (1924): Biochem. Z., 146, 275.
Holm, G. E. u. Greenbank, G. R. (1923): J. Americ. Chem. Soc., 45, 1788.

- Homer, A. (1915): J. biol. Chem., **22**, 369.
Itagaki, Ch. u. Masayama, T. (1936): Osaka Igakukai Zasshi (Japanisch), **35**, 1743.
Iwabuchi, T. (1936): J. of Biochem., **24**, 447.
Komm, E. (1926): Z. f. physiol. Chem., **156**, 161.
Kotake, Y. (1936): Z. f. physiol. Chem., **243**, 237.
Kraus-Ragins, I. (1925): J. biol. Chem., **63**, 157.
Kraus-Ragins, I. (1928): J. biol. Chem., **80**, 551.
Krebs, H. A. (1933): Z. f. physiol. Chem., **217**, 191.
Kurihara, Z. (1939): J. of Biochem., **30**, 205.
Levene, P. A. u. Rouiller, C. A. (1907): J. biol. Chem., **2**, 481.
Lüscher, E. (1922): Biochem. J., **16**, 556.
Neuberg, C. u. Popowsky, N. (1907): Biochem. Z., **2**, 357.
Sera, K. (1938): Nihon Seikag. Kh. (Japanisch), **13**, 141.
Sera, K. (1940): Nihon Seikag. Kh. (Japanisch), **15**, 134.
Tillmans, J. u. Alt, A. (1925): Biochem. Z., **164**, 135.

STUDIEN ÜBER DIE BLUT- UND HARN- PHOSPHATASE.

VON

KENZO OHNO.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 15. November 1940)

Die Beeinflussbarkeit des Blutphosphatasegehalts durch die physiologischen und pathologischen Körperzustände wurde schon oft studiert. Kay (1930) berichtete zuerst, dass die Blutphosphatase bei Knochenerkrankungen stark zunimmt, und dieser Befund wurde nachher von vielen Autoren bestätigt. Man sieht daraus die Anwesenheit des innigen Zusammenhangs zwischen dem Blutphosphatasegehalt und dem Umsatz des Knochens, aber es zeigt nicht unbedingt, dass die Ferment auch im normalen Zustand ausschliesslich aus dem Knochen her stammt. Es ist überhaupt schwer zu entscheiden, aus welchem Organ die Blutphosphatase geliefert wird, wie man bei der Blutamylase und der Blutlipase erfahren hat. Armstrong und Banting (1935) haben bei einem eviszerierten Hunde keine Abnahme der Serumphosphatase beobachtet und deshalb behauptet, dass dieses Ferment aus den Knochen und nicht aus den Eingeweiden herrührt. Bodansky (1934) hat jedoch angegeben, dass der abgenommene Serumphosphatasegehalt des fastenden Hundes bei der Verabreichung von Dextrin oder Glukose steigt, womit er bewiesen haben will, dass dieses Ferment möglicherweise aus Leber, Dünndarm oder Niere her stammt. Unter diesen Organen scheint die Leber die innigste Beziehung zur Blutphosphatase zu haben. Die Zunahme dieses Ferments bei Lebererkrankungen wurde zuerst von Roberts (1930) nachgewiesen und von Bodansky und Jaffe (1933-34), Bodansky (1937), Herbert (1935), Rothman, Meranze und Meranze (1936), Thannhauser u. a. (1937),

Freeman und Chen (1938) und anderen durch klinische Untersuchungen und Tierexperimente bestätigt. Vor allem ist die Angabe von Armstrong und King (1934, 1935) interessant, dass bei dem Hunde die Unterbindung des Gallengangs eine starke Zunahme der Serumphosphatase bewirkt, während beim latenten hämolytischen Ikterus und beim Phenylhydrazinikterus der Phosphatasegehalt keine Veränderung erfährt. Auf diese Weise ist es nun möglich, den obstruktiven Ikterus durch Phosphatase-messung vom hämolytischen Ikterus zu unterscheiden. Aber man ist noch nicht imstande, enzymologisch den obstruktiven vom toxischen Ikterus einwandfrei zu unterscheiden. Greene u. a. (1934) erkannten eine Vermehrung des Serumphosphatasegehalts in beiden Fällen. Herbert (1935) hingegen vertritt die Meinung, dass sich beim toxischen Ikterus der Plasmaphosphatasewert nicht immer vermehrt. Roberts (1933), Rothman, Meranze und Meranze (1936) behaupten, dass wohl bei beiden Ikterusarten eine Zunahme der Plasmaphosphatase bemerkt werden kann, deren Grad aber bei den beiden Fällen deutlich von einander verschieden ist.

Ich habe nun den Blutphosphatasewert des Kaninchens bei Gallengangunterbindung, Lebergiftverabreichung und Phenylhydrazineinspritzung untersucht. Als Lebergift wurden Phosphor und Kohlenstofftetrachlorid gebraucht.

Ich habe dabei zur Blutphosphatasebestimmung die Methode von Fujita (1939) angewandt. Diese unterscheidet sich von anderen Methoden dadurch, dass man als Substrat nicht das Glycerophosphat oder Phenylphosphat, sondern *p*-Nitrophenolphosphat benutzt und dass man nicht das abgespaltene anorganische Phosphat, sondern das freie *p*-Nitrophenol misst, weshalb kein Kontrollversuch notwendig ist. Wegen der leichten Ausführbarkeit der kolorimetrischen Bestimmung einer kleinen Menge des *p*-Nitrophenols ist 0.1 ccm Blut schon hinreichend, um den Fermentgehalt der Erythrocyten und des Plasmas gesondert zu bestimmen. Diese Methode ist auch zur Bestimmung des Phosphatasegehalts der Organe geeignet, weil ein frisches Organ als wässrige Suspension sogleich zum Experiment verwendbar ist.

Der Versuch ergab, dass sich der Plasmaphosphatasewert bei Gallengangunterbindung und Lebergiftverabreichung stark, aber bei Phenylhydrazininjektion gar nicht erhöht. In den beiden ersten Fällen merkt man ausserdem keine Veränderung des Phosphatasegehalts der Erythrocyten, im letzten Fall hingegen tritt eine deutliche Herabsetzung des Erythrocytenmonoesterasewerts ein, die ohne Zweifel dem Blutzellenzerfall zuzuschreiben ist. Austritt des Erythrocyteninhalts verursacht aber keine Zunahme der Plasmaphosphatase, weil die Erythrocytenmonoesterase in alkalischer Reaktion wie bei $\text{pH } 9$, wo der Plasmamonoesterasewert bestimmt wird, auf das *p*-Nitrophenolphosphat nicht mehr wirksam ist.

Daraus ergibt sich, dass man durch das Verhalten der Blutphosphatase den obstruktiven und toxischen Ikterus von dem hämolytischen unterscheiden kann, aber dass durch die einfache Blutphosphatasemessung die Differenzierung der beiden ersten voneinander fast unmöglich ist.

Es wird allgemein behauptet, dass der Gallengangverschluss als seine frühe Reaktion die Disfunktion der Leberzelle hervorruft und den Übergang der normalen Gallenbestandteile in die Blutbahn verursacht, während der toxische Ikterus von vornherein eine Folgeerscheinung der organischen Schädigung des Leberparenchyms ist. Die Vermehrung der Plasmaphosphatase nach Gallengangunterbindung muss dadurch entstanden sein, dass die Ausscheidung der Phosphatase in die Gallenkapillaren wegen der Sperrung des Abführungswegs gestört wird und dann dieses Ferment wie der Gallenfarbstoff ins Blut übergeht. In der aus der Leber normal ausfliessenden Galle ist die Phosphomonoesterase vorhanden, die wie die Plasmaphosphatase in alkalischer Reaktion wirksam ist. Andererseits soll die Plasmaphosphatasevermehrung bei der Lebergiftverabreichung der Überschwemmung des Ferments aus dem zerfallenen Lebergewebe zugeschrieben werden. Diese Annahme bedarf aber des experimentellen Beweises. Die dazu ausgeführten Versuche werden nun beschrieben.

Die Veränderung des Phosphatasegehalts der Organe bei verschiedenen Ikterusformen ist sehr interessant. Die untersuchten

Organe waren Leber, Niere und Muskel. Bei der Vergiftung durch Phosphor und Kohlenstofftetrachlorid vermindert sich die Phosphatase der Leber in beträchtlichem Grade, die der Niere und des Muskels bleibt aber unverändert. Bei der Gallengangunterbindung dagegen erfährt der Phosphatasegehalt der Organe keine Veränderung. Die Abnahme der Leberphosphatase wird also in auffallender Weise im Fall der Lebergiftverabreichung beobachtet, weshalb sie mit der Zunahme der Plasmaphosphatase eine ursächliche Beziehung haben muss. Bei der Gallengangunterbindung, die eine einfache Ablenkung der Richtung der Phosphatase- und Bilirubinsekretion nach der Blutbahn hervorruft, bleibt der Phosphatasegehalt der Leber erwartungsgemäss unverändert.

Wenn man aber dies alles eingehend bedenkt, so braucht die Zunahme des Plasmaphosphatasewerts bei Gallengangunterbindung nicht unbedingt eine Zunahme der Phosphatase selbst zu sein, sondern es könnte wohl genügen, wenn möglicherweise bloss der Phosphataseaktivator zunimmt. Eine solche Annahme wurde von Thannhauser angegeben. Thannhauser u. a. (1937) hat zuerst geglaubt, dass die Ascorbinsäure die Serumphosphatase aktiviert, was aber von ihnen selbst später (1938) richtig gestellt wurde. In demselben Jahre hat Thannhauser u. a. dann behauptet, dass die starke Phosphatasewirkung der pathologischen Sera durch Vermehrung des Aktivators verursacht wird.

Abgesehen von der wirklichen Zunahme der Phosphatase, kann die Steigerung der Phosphataseaktivität durch zwei Momente hervorgerufen werden. Erstens die Plasmaphosphatase ist im normalen Zustande hauptsächlich als Apo-Phosphatase vorhanden und die für ihr Verwandeln zum Holoferment notwendigen Co-Phosphatase ist von der geschädigten Leber geliefert worden. Zweitens die Phosphatase des normalen Blutes ist schon an sich in aktiver Form, aber ihre hydrolytische Wirkung wird durch irgendeine dritte Substanz beschleunigt, die die geschädigte Leber gerade dem Blut liefern würde. Diese zwei Möglichkeiten kann ich aber durch folgende Experimente ausschliessen. Ich habe dem normalen Plasma eine Co-Phosphataselösung zugesetzt, aber keine Verstärkung der hydrolytischen Wirkung beobachtet. Über die

Herstellung und Eigenschaften der Co-Phosphatase wird bald aus dem hiesigen Institut berichtet werden. Das Plasma oder Serum des phosphorvergifteten Kaninchens wurde andererseits erhitzt und dem normalen Plasma zugesetzt, jedoch konnte keine Steigerung des Plasmaphosphatasewerts beobachtet werden. Ich habe weiter normales Plasma mit dem des Stauungsikterus gemischt. Die Phosphataseaktivität des gemischten Plasmas war eine einfache Summe der Aktivität der einzelnen Plasmaarten. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der hohe Plasmaphosphatasewert nach der Gallengangunterbindung tatsächlich mit der wirklichen Zunahme des Ferments zu tun hat.

Wenn unser Schluss, dass die Phosphatasezunahme bei der Gallengangunterbindung durch Disfunktion der Leberzelle, während die des toxischen Ikterus durch Überfließen der Phosphatase aus den geschädigten Leberzellen hervorgerufen wird, richtig wäre, so muss daraus folgen, dass sich die anderen Bestandteile der Galle oder des Leberzellinhalts in gleicher Weise wie die Phosphatase verhalten würden. Als eine solche Substanz habe ich β -Glukosidase gewählt. Sie ist als ein Testferment besonders geeignet, weil sie in der Leber recht reichlich, dagegen weder in der Galle noch im Blut vorkommt. Die Untersuchung auf die β -Glukosidase wurde mit *p*-Nitrophenol- β -Glukosid als Substrat ausgeführt. Über den kolorimetrischen Nachweis der β -Glukosidase hat schon Aizawa (1939) aus dem hiesigen Institut berichtet.

Die Untersuchung auf die β -Glukosidase ergab, dass bei Kohlenstofftetrachloridvergiftung oder Phosphorvergiftung eine starke β -Glukosidase im Blut auftritt, aber keineswegs bei der Gallengangunterbindung. Ich habe dann wie bei der Phosphataseuntersuchung die Veränderung des β -Glukosidasegehalts der Organe gemessen. Das Ergebnis war, dass die Leber- β -Glukosidase bei der Kohlenstofftetrachloridvergiftung und besonders in starkem Grad bei der Phosphorvergiftung abnimmt, aber bei der Gallengangunterbindung keine Verminderung erfährt. Dasselbe Ferment der Niere bleibt bei allen Fällen unverändert. Diese β -Glukosidaseuntersuchung bestätigte unsere Annahme, dass bei toxischem Ikterus der Zerfall des Lebergewebes den Übergang der

Zellfermente, sowohl Phosphatase wie β -Glukosidase, ins Blut bewirkt, während sich bei obstruktivem Ikterus wegen seiner Entstehungsweise nur die normal in die Galle auszuschheidende Phosphatase im Blut vermehrt, aber keine β -Glukosidase sich darin vorfinden lässt, weil sie in normaler Galle nicht vorhanden ist. Man kann daher zuerst durch die Bestimmung der Plasmaphosphatase den hämolytischen Ikterus von dem obstruktiven und toxischen Ikterus, und dann durch die Bestimmung der β -Glukosidase die beiden letzteren von einander unterscheiden.

Ich habe weiterhin untersucht, ob bei Nierenschädigung durch Uranyl nitrat, Kaliumbichromat oder Sublimatinspritzung irgendeine Veränderung des Blutphosphatasegehalts eintritt. Es war nicht der Fall. Ich konnte aber nachweisen, dass nach dieser Gifteinspritzung nur in der Niere eine Verminderung der Phosphatase eintrat, während der Phosphatasegehalt der Leber und des Muskels sich nicht veränderte. Wenn die Phosphatase der Niere sich vermindert und trotzdem ein Übergang dieses Ferments ins Blut nicht nachweisbar ist, so muss aber der Phosphatasegehalt des Harns zugenommen haben. Das Experiment ergab, dass es tatsächlich der Fall ist. Kaninchenharn enthält gewöhnlich nur eine alkalische Phosphatase, deren Menge nach Einspritzung der Nierengifte sich auf das 3 bis 7 fache vermehrt.

Bei dieser Gelegenheit beschreibe ich eine besondere Bestimmungsmethode der Harnphosphatase. Die Existenz der sauren Phosphatase im Menschenharn wurde zuerst von Demuth (1925) festgestellt und später von Waldschmidt-Leitz und Nonnenbruch (1935), Dmochowski und Assenhajm (1935) und weiter von Kutscher (1935) bestätigt. Aber andererseits ist es schon bekannt, dass die alkalische Phosphatase auch im Katzenharn vorhanden ist. Die Phosphatase des Kaninchenharns ist auch in alkalischer Reaktion wirksam. Bis jetzt hat man es bei der Messung der Harnphosphatase so gemacht, dass man den aus dem zugesetzten Glycerophosphat oder Phenylphosphat abgespalteten anorganischen Phosphor bestimmt und von dem bemessenen Wert den Kontrollwert abzieht.

Die Messung der Harnphosphatase wird durch die Anwendung

der *p*-Nitrophenolmethode sehr erleichtert. Harnfarbstoffe, die die Kolorimetrie des *p*-Nitrophenols stören, werden mittels Bleiacetat beseitigt. Diese Methode ist unter Gebrauch des Acetatpuffers auch an Menschenharn, der die saure Phosphatase enthält, ausführbar. Hier beschreibe ich nur die Bestimmung der alkalischen Harnphosphatase.

Reagenzien:

1. *M*/1000 Natrium *p*-Nitrophenolphosphat.
2. *M*/10 Glykokoll-Natronpuffer von $\text{pH } 9$.
3. 2% Bleiacetat.
4. Gesättigte Natriumcarbonatlösung.

Methodik:

Man entnimmt mittels Katheters den Blasenharn des Kaninchens, zentrifugiert, 1,0 ccm überstehende Lösung wird mit 4,0 ccm *M*/10 Glykokoll-Natronpuffer ($\text{pH } 9$) und 5,0 ccm *M*, 1000 Natrium *p*-Nitrophenolphosphat gemischt. Die Endkonzentration des Substrates ist *M*/2000. Man stellt das Gemisch für zwei Stunden in ein Wasserbad von 37°C , gibt dann gleiches Volumen 2% Bleiacetat hinzu und filtriert. 5,0 ccm schwach sauer reagierendes Filtrat werden in einen 10 ccm grossen Messzylinder genommen, mit 4,0 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung versetzt und mit Wasser auf 10,0 ccm aufgefüllt. Die vom Bleicarbonat abfiltrierte Lösung dient sogleich zur Kolorimetrie. Die Vergleichslösung ist eine alkalische *p*-Nitrophenollösung von bekannter Konzentration. Das *p*-Nitrophenol wird weder durch Bleiacetat gefällt noch in alkalischer Reaktion von dem Bleicarbonat adsorbiert.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die dem Herrn Professor von dem Unterrichtsministerium zur Förderung der wissenschaftlichen Forschungen zur Verfügung gestellt wurde.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. Bestimmung der Blutphosphatase.

Zur Bestimmung der Blutphosphatase wurde die Methode von

Fujita (1939) verwendet. Bei der Plasmaphosphatase war die Versuchsdauer 2–4 Stunden. In den nachstehenden Tabellen sind das für 1 Stunde berechnete hydrolytische Prozent und der daraus ermittelte Phosphatasewert angegeben.

2. Bestimmung der Organ- und Gallenphosphatase.

Man zerreibt ein nach Carotisschnitt entnommenes Organ und macht eine Suspension in 50 fachem Volumen physiologischer Kochsalzlösung. Die Lebergalle wird durch die in den Ductus eingesteckte Glaskanüle gesammelt und unverdünnt zum Versuch gebraucht.

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war folgende:

$M/1000$ Natrium <i>p</i> -Nitrophenolphosphat	5,0 ccm
Organsuspension oder Galle	1,0 „
Pufferlösung	4,0 „

Als Pufferlösung wurde $M/2$ Essigsäure-Acetat und $M/10$ Glykokoll-Natron verwendet. Die Endkonzentration des Substrates war $M/2000$.

3. Bestimmung der β -Glukosidase.

Als Substrat diente *p*-Nitrophenol- β -Glukosid von Aizawa (1939).

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war folgende:

$M/1000$ <i>p</i> -Nitrophenol- β -Glukosid	5,0 ccm
Serum, Galle oder Organsuspension	1,0 „
Pufferlösung	4,0 „
Toluol	einige Tropfen

Serum oder Galle wurde unverdünnt, Organsuspension dagegen in 20 fachem Volumen Wasser gebraucht. Als Pufferlösung diente $M/2$ Essigsäure-Acetat und $M/10$ Phosphat. Weiter vergleiche die Mitteilung von Aizawa (1939) und anderen.

Ergebnisse.

I. EXPERIMENTE BEIM TOXISCHEN, STAUUNGS- UND HÄMOLYTISCHEN IKTERUS.

A. Blutphosphatase.

1. Kohlenstofftetrachloridvergiftung (Tabelle I, II u. III).

0,4 ccm CCl_4 pro kg Körpergewicht wurde mit der gleichen Menge Olivenöl gemischt und durch Gummibougie in den Magen eingeführt.

TABELLE I.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,30	2,6	0,87	26,6	24,0
nach 1 Tage	2,23	8,8	2,98	27,2	24,8
" 2 Tagen	2,20	7,9	2,68	27,0	24,8
" 3 "	2,18	7,5	2,53	27,9	25,6
" 4 "	2,15	7,2	2,45	27,5	25,2
" 5 "	2,10	7,3	2,48	26,8	24,4

TABELLE II.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,55	2,5	0,83	34,5	33,2
nach 1 Tage	2,50	6,3	2,12	33,3	31,6
" 2 Tagen	2,40	5,8	1,97	35,0	33,6
" 3 "	2,45	6,7	2,27	34,0	30,8
" 4 "	2,50	6,6	2,23	30,8	28,8
" 5 "	2,53	7,5	2,53	32,8	31,2

TABELLE III.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 3			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,15	2,3	0,77	30,5	28,4
nach 1 Tage	2,10	9,6	3,28	32,5	30,8
" 2 Tagen	1,85	9,7	3,31	31,0	29,2
" 3 "	gestorben				

2. *Phosphorvergiftung* (Tabelle IV, V u. VI).

0,04 g Nekoirazu pro kg Körpergewicht, ein handelsübliches Phosphorpräparat zur Tötung von Ratten, wurde per os verabreicht.

TABELLE IV.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,25	2,2	0,72	35,4	34,0
nach 1 Tage	2,20	2,5	0,83	36,0	34,8
" 2 Tagen	2,10	13,1	4,58	35,0	33,6
" 3 "	gestorben				

TABELLE V.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	1,94	2,6	0,87	30,0	28,0
nach 1 Tage	1,90	4,6	1,52	31,5	29,6
" 2 Tagen	1,83	15,4	5,45	30,6	28,4
" 3 "	gestorben				

TABELLE VI.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 3			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,23	2,1	0,68	29,0	26,8
nach 1 Tage	2,20	4,2	1,40	28,4	26,0
" 2 Tagen	2,15	16,9	6,03	30,5	28,4
" 3 "	gestorben				

3. Gallengangunterbindung (Tabelle VII u. VIII).

TABELLE VII.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,05	3,1	1,02	35,2	34,0
nach 1 Tage	1,93	22,5	8,30	34,6	33,2
" 2 Tagen	1,80	23,0	8,53	32,4	30,8
" 3 "	1,72	15,9	5,63	33,6	32,0
" 4 "	gestorben				

TABELLE VIII.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	2,45	2,3	0,93	28,5	26,8
nach 1 Tage	2,30	16,9	6,03	30,2	28,0
" 2 Tagen	2,25	17,8	6,40	29,5	27,2
" 3 "	2,10	9,4	3,23	30,0	28,0
" 4 "	2,03	15,0	5,28	31,5	29,6
" 5 "	gestorben				

4. Phenylhydrazinvergiftung (Tabelle IX, X u. XI).

5%ige wässrige Lösung des Phenylhydrazinhydrochlorids wird mit konzentrierter Natronlauge neutralisiert. 0,05 g Chlorid pro kg Körpergewicht wird subkutan eingespritzt.

TABELLE IX.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem Versuch	3,05	1,5	0,48	28,5	26,4
nach 1 Tage	3,00	2,6	0,87	7,6	6,0
" 2 Tagen	2,96	2,5	0,83	8,3	6,8
" 3 "	2,96	1,6	0,52	12,1	10,0
" 4 "	2,90	1,9	0,62	13,4	11,2

TABELLE X.

	Körper- gewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase- wert	%	Monoesterase- wert
vor dem Versuch	2,34	2,7	0,90	30,5	28,4
nach 1 Tage	2,33	3,0	1,00	10,2	8,4
" 2 Tagen	2,35	2,9	0,97	16,4	14,0
" 3 "	2,30	2,6	0,87	18,2	15,6
" 4 "	2,27	2,8	0,93	18,6	16,0

TABELLE XI.

	Körper- gewicht (kg)	Nr. 3			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase- wert	%	Monoesterase- wert
vor dem Versuch	2,67	2,4	0,80	35,5	34,4
nach 1 Tage	2,62	3,9	1,30	11,5	9,6
" 2 Tagen	2,62	3,4	1,12	16,0	13,6
" 3 "	2,57	2,3	0,77	17,4	15,6
" 4 "	gestorben				

B. Organphosphatase.

1. Normal (Tabelle XII).

TABELLE XII.

Organ	PH	Nr. 1			Nr. 2		
		37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
		4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber		36,5%	56,0%	46,1%	34,2%	53,3%	51,0%
Niere		35,2%	46,1%	87,2%	33,3%	42,8%	85,7%
Muskel		0	11,5%	0	0	12,0%	0

2. *Kohlenstofftetrachloridvergiftung* (Tabelle XIII).

2 Tage nach der Verabreichung von 0,4 ccm CCl_4 pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XIII.

Organ \ PH	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber	23,5%	35,2%	27,2%	24,0%	33,1%	36,3%
Niere	33,5%	40,2%	87,5%	30,6%	43,6%	86,0%
Muskel	0	9,2%	0	0	10,5%	0

3. *Phosphorvergiftung* (Tabelle XIV).

2 Tage nach der Verabreichung von 0,04 g Nekoirazu pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XIV.

Organ \ PH	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber	20,6%	28,1%	25,0%	22,0%	30,5%	26,5%
Niere	34,8%	40,0%	83,5%	30,5%	36,8%	89,6%
Muskel	0	10,2%	0	0	12,0%	0

4. *Gallengangunterbindung* (Tabelle XV).

Einen Tag nach der Gallengangunterbindung wurden die Tiere getötet.

TABELLE XV.

Organ \ PH	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber	35,2%	40,2%	52,1%	35,2%	35,9%	44,4%
Niere	36,6%	45,1%	84,5%	38,7%	49,1%	82,1%
Muskel	0	8,1%	0	0	10,0%	0

C. *Gallenphosphatase des normalen Kaninchens.*

TABELLE XVI.

	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
PH	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
%	0	0	28,5	0	0	33,3
Monoesterasewert	0	0	0,67	0	0	0,79

D. *β -Glukosidase des Kaninchenserums.*1. *Kohlenstofftetrachloridvergiftung (Tabelle XVII).*

TABELLE XVII.

	Nr. 1	Nr. 2
	PH 7; 37°, nach 3 Stdn.	PH 7; 37°, nach 3 Stdn.
vor dem Versuch	0	0
nach 1 Tage	84,2%	88,8%

2. *Phosphorvergiftung (Tabelle XVIII).*

TABELLE XVIII.

	Nr. 1	Nr. 2
	PH 7; 37°, nach 3 Stdn.	PH 7; 37°, nach 3 Stdn.
vor dem Versuch	0	0
nach 2 Tagen	85,1%	88,8%

3. Gallengangunterbindung (Tabelle XIX).

TABELLE XIX.

	Nr. 1	Nr. 2
	PH 7; 37°, nach 3 Std.	PH 7; 37°, nach 3 Std.
vor dem Versuch	0	0
nach 1 Tage	Spur	Spur

E. β -Glukosidase des Kaninchenorgans.

1. Normal (Tabelle XX).

TABELLE XX.

	Nr. 1				Nr. 2			
	37°; nach 1 Stde.				37°; nach 1 Stde.			
PH Organ	5,0	6,0	7,0	8,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Leber	82,5%	91,1%	96,4%	79,3%	86,3%	92,5%	94,1%	80,0%
Niere	61,5%	69,4%	73,5%	57,1%	56,5%	66,3%	70,5%	53,2%
Muskel	0	0	0	0	0	0	0	0

2. Kohlenstofftetrachloridvergiftung (Tabelle XXI).

Einen Tag nach der Verabreichung von 0,4 ccm CCl_4 pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XXI.

	Nr. 1	Nr. 2
	PH 7; 37°, nach 1 Stde.	PH 7; 37°, nach 1 Stde.
Leber	70,5%	72,6%
Niere	72,5%	68,4%
Muskel	0	0

3. Phosphorvergiftung (Tabelle XXII).

2 Tage nach der Verabreichung von 0,04 g Nekoirazu pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XXII.

	Nr. 1	Nr. 2
	PH 7; 37°, nach 1 Stde.	PH 7; 37°, nach 1 Stde.
Leber	35,2%	33,3%
Niere	80,0%	66,4%
Muskel	0	0

4. Gallengangunterbindung (Tabelle XXIII).

Einen Tag nach der Gallengangunterbindung wurden die Tiere getötet.

TABELLE XXIII.

	Nr. 1	Nr. 2
	PH 7; 37°, nach 1 Stde.	PH 7; 37°, nach 1 Stde.
Leber	89,2%	90,2%
Niere	68,2%	71,6%
Muskel	0	0

F. β -Glukosidase der normalen Kaninchengalle (Tabelle XXIV).

TABELLE XXIV.

	Nr. 1				Nr. 2			
	37°; nach 24 Stdn.				37°; nach 24 Stdn.			
РН	5,0	6,0	7,0	8,0	5,0	6,0	7,0	8,0
%	0	0	0	0	0	0	0	0

G. Der Einfluss von 1) Plasma des obstruktiven Ikterus,
2) Co-Phosphatase und 3) erhitztem phosphorver-
giftetem Kaninchenplasma bzw. -Serum auf
die normale Plasmaphosphatase.

1. Plasma des obstruktiven Ikterus (Tabelle XXV).

Man lässt 0,1 cem Blut der Kaninchen, deren Gallengang 1 Tag

vorher unterbunden wurde, und dieselbe Menge normalen Kaninchenblutes in je 5,0 ccm neutrale verdünnte Citratlösung (10% Handelseitratlösung für die Bluttransfusion wird mit physiologischer Kochsalzlösung 10 fach verdünnt) einfließen.

	Versuch a	Versuch b	Versuch c
M/400 Natrium <i>p</i> -Nitrophenolphosphat	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm
Verdünntes normales Kaninchenplasma	1,5 „	0 „	1,5 „
Verdünntes Plasma des obstruktiven Ikterus	0 „	1,5 „	1,5 „
Verdünnte Citratlösung	1,5 „	1,5 „	0 „
Pufferlösung	1,0 „	1,0 „	1,0 „

Pufferlösung ist das Gemisch aus gleichen Volumina von M/10 Glykokoll-Natron (PH 9,0) und M/20 MgCl₂.

TABELLE XXV.

	Nr. 1			Nr. 2		
	a	b	c	a	b	c
%	1,3	7,2	7,5	1,1	5,3	5,6
Monoesterasewert	0,83	4,90	5,06	0,70	3,57	3,73

2. Co-Phosphatase (Tabelle XXVI).

	Versuch a	Versuch b
M/400 Natrium <i>p</i> -Nitrophenolphosphat	1,0 ccm	1,0 ccm
Normales verdünntes Kaninchenplasma	1,5 „	1,5 „
Co-Phosphatase	0 „	1,5 „
Wasser	1,5 „	0 „
Pufferlösung	1,0 „	1,0 „

TABELLE XXVI.

	Nr. 1		Nr. 2	
	a	b	a	b
%	1,1	1,2	1,8	2,1
Monoesterasewert	0,70	0,77	1,13	1,37

3. *Erhitztes phosphorvergiftetes Kaninchenplasma bzw. Serum*
(Tabelle XXVII).

	Versuch a	Versuch b	Versuch c
M/400 Natrium <i>p</i> -Nitrophenolphosphat	1,0 cem	1,0 cem	1,0 cem
Verdünntes normales Plasma	1,0 „	1,0 „	1,0 „
Verdünntes erhitztes phosphorvergiftetes Plasma	0 „	2,0 „	0 „
Verdünntes erhitztes phosphorvergiftetes Serum	0 „	0 „	2,0 „
Wasser	2,0 „	0 „	0 „
Pufferlösung	1,0 „	1,0 „	1,0 „

Das verdünnte Plasma des normalen Kaninchens wird in diesem Falle so gewonnen, dass man 0,3 cem Blut des normalen Kaninchens in 4,7 cem Citratlösung einfließen lässt und zentrifugiert. 1,0 cem überstehende Lösung entspricht 3/50 cem Blut oder 3,0 cem verdünntem Plasma bei dem Fujitaschen Verfahren. Man lässt andererseits 0,1 cem Blut des phosphorvergifteten Kaninchens in 5,0 cem Citratlösung einfließen und zentrifugiert. Man erhitzt die überstehende Lösung 3 Minuten lang auf 100°C und filtriert.

Erhitztes verdünntes Serum wird in folgender Weise bereitet. Man verdünnt das phosphorvergiftete Kaninchenserum auf das 5 fache mit physiologischer Kochsalzlösung, macht es mit Salzsäure zu PH 5, filtriert nach 3 Minuten langer Erhitzung auf 100°C und macht das Filtrat mit Natronlauge zu PH 9.

TABELLE XXVII.

	Nr. 1			Nr. 2		
	a	b	c	a	b	c
%	2,5	2,4	2,3	2,2	2,2	2,3
Monoesterasewert	0,83	0,80	0,77	0,72	0,72	0,77

II. EXPERIMENTE BEI EXPERIMENTELLEN
NIERENSCHÄDIGUNGEN.

A. *Blutphosphatase.*

1. *Urannephritis* (Tabelle XXVIII u. XXIX).

Subkutane Injektion von 1%iger Uranylнитratlösung (0,01 g Nitrat pro kg Körpergewicht).

TABELLE XXVIII.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem versuch	2,00	2,4	0,80	32,8	31,2
nach 1 Tage	1,95	2,3	0,77	30,6	28,4
" 2 Tagen	1,96	2,5	0,83	31,2	29,2
" 3 "	1,83	2,4	0,80	32,5	30,8

TABELLE XXIX.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem versuch	2,46	2,7	0,90	28,5	26,8
nach 1 Tage	2,47	2,8	0,93	30,6	28,4
" 2 Tagen	2,56	2,5	0,83	32,6	30,8
" 3 "	2,50	2,4	0,80	31,5	29,6

2. *Kaliumbichromatnephritis* (Tabelle XXX u. XXXI).

Subkutane Injektion von 1,5%iger Kaliumbichromatlösung (0,015 g Bichromat pro kg Körpergewicht).

TABELLE XXX.

	Körpergewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase-wert	%	Monoesterase-wert
vor dem versuch	2,68	3,0	1,00	35,3	34,0
nach 1 Tage	2,65	2,9	0,97	33,3	31,6
" 2 Tagen	2,67	2,6	0,87	34,7	33,2
" 3 "	2,80	2,8	0,93	32,6	30,8

TABELLE XXXI.

	Körper- gewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase- wert	%	Monoesterase- wert
vor dem versuch	1,80	2,7	0,90	30,0	28,0
nach 1 Tage	1,75	3,0	1,00	29,2	26,8
" 2 Tagen	1,73	3,0	1,00	28,5	26,4
" 3 "	1,73	3,3	1,08	26,6	24,0

3. *Sublimatnephritis* (Tabelle XXXII u. XXXIII).

Subkutane Injektion von 1,5%iger Sublimatlösung (0,015 g Sublimat pro kg Körpergewicht).

TABELLE XXXII.

	Körper- gewicht (kg)	Nr. 1			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase- wert	%	Monoesterase- wert
vor dem versuch	2,00	2,5	0,83	34,6	33,2
nach 1 Tage	1,95	2,0	0,65	32,1	30,3
" 2 Tagen	1,83	2,3	0,77	34,6	33,2
" 3 "	1,70	3,0	1,00	33,0	31,3

TABELLE XXXIII.

	Körper- gewicht (kg)	Nr. 2			
		Plasma		Erythrocyten	
		%	Monoesterase- wert	%	Monoesterase- wert
vor dem versuch	2,50	2,2	0,72	32,5	30,8
nach 1 Tage	2,48	1,9	0,62	30,7	28,8
" 2 Tagen	2,48	2,1	0,68	34,0	32,4
" 3 "	2,36	2,0	0,65	32,6	30,8

B. *Organphosphatase*.

1. *Urannephritis* (Tabelle XXXIV).

3 Tage nach Injektion von 0,01 g Uranylнитrat pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XXXIV.

Organ \ PH	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber	32,3%	41,5%	40,2%	34,6%	43,2%	44,6%
Niere	34,2%	30,0%	24,0%	35,3%	30,2%	23,5%
Muskel	0	8,5%	0	0	9,8%	0

2. *Kaliumbichromatnephritis* (Tabelle XXXV).

3 Tage nach Injektion von 0,015 g Kaliumbichromat pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XXXV.

Organ \ PH	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber	34,5%	52,0%	48,8%	32,6%	48,1%	45,6%
Niere	35,0%	32,4%	48,0%	31,5%	41,8%	53,0%
Muskel	0	12,3%	0	0	11,5%	0

3. *Sublimatnephritis* (Tabelle XXXVI).

3 Tage nach Injektion von 0,015 g Sublimat pro kg Körpergewicht wurden die Tiere getötet.

TABELLE XXXVI.

Organ \ PH	Nr. 1			Nr. 2		
	37°; nach 1 Stde.			37°; nach 1 Stde.		
	4,2	5,6	9,0	4,2	5,6	9,0
Leber	32,4%	46,5%	43,2%	35,4%	48,2%	46,3%
Niere	37,5%	28,7%	37,5%	34,6%	47,5%	43,5%
Muskel	0	10,6%	0	0	9,8%	0

C. Harnphosphatase.

Der Harn wurde durch Katheterisation gewonnen. Bei wenigen Fällen war in dem unter dem Käfig gestellten Becher spontan entleerter Harn gewesen. Dieser wurde mit dem Blasen-harn gemischt und damit die Phosphatasebestimmung ausgeführt. Die Harnmenge in nachstehenden Tabellen bedeutet die des während 24 Stunden gesammelten Harns.

1. *Urannephritis* (Tabelle XXXVII).

TABELLE XXXVII.

	Nr. 1		Nr. 2	
	37°; PH 9, nach 2 Stdn.		37°; PH 9, nach 2 Stdn.	
	%	Harnmenge	%	Harnmenge
vor dem Versuch	8,0	90 ccm	7,1	80 ccm
nach 1 Tage	25,0	100 "	24,2	80 "
" 2 Tagen	36,0	90 "	38,5	120 "
" 3 "	60,0	30 "	53,6	30 "

2. *Kaliumbichromatnephritis* (Tabelle XXXVIII).

TABELLE XXXVIII.

	Nr. 1		Nr. 2	
	37°; PH 9, nach 2 Stdn.		37°; PH 9, nach 2 Stdn.	
	%	Harnmenge	%	Harnmenge
vor dem Versuch	5,8	80 ccm	7,8	100 ccm
nach 1 Tage	15,0	70 "	13,2	90 "
" 2 Tagen	18,4	130 "	17,4	120 "
" 3 "	21,5	60 "	20,5	80 "

3. *Sublimatnephritis* (Tabelle XXXIX).

TABELLE XXXIX.

	Nr. 1		Nr. 2	
	37°; PH 9, nach 2 Stdn.		37°; PH 9, nach 2 Stdn.	
	%	Harnmenge	%	Harnmenge
vor dem Versuch	7,6	60 ccm	8,1	50 ccm
nach 1 Tage	12,8	100 "	13,0	60 "
" 2 Tagen	15,8	80 "	15,3	50 "
" 3 "	19,0	80 "	18,5	70 "

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Plasmaphosphatasegehalt des Kaninchens nimmt beim obstruktiven und toxischen Ikterus zu, bleibt jedoch beim hämolytischen Ikterus unverändert. Die Serum- β -Glukosidase zeigt eine bemerkenswerte Vermehrung beim toxischen Ikterus, bleibt aber beim obstruktiven Ikterus unverändert. Daraus ergibt sich, dass man einerseits durch die Bestimmung der Plasmaphosphatase den hämolytischen Ikterus von dem obstruktiven und toxischen Ikterus und andererseits durch die Bestimmung der β -Glukosidase die beiden letzteren von einander unterscheiden kann.

2. Beim toxischen Ikterus vermindert sich sowohl der Phosphatase- als auch β -Glukosidasegehalt der Leber, dagegen bleiben beide beim obstruktiven Ikterus unverändert. Das bedeutet, dass beim toxischen Ikterus die Fermente der Leberzellen durch die Schädigung des Gewebes ins Blut übergehen und dass sich damit sowohl der Phosphatase- wie auch β -Glukosidasegehalt des Blutes vermehrt. Der obstruktive Ikterus tritt auf, wenn die Gallenbestandteile durch die Disfunktion der Leber ins Blut abgesondert werden. Infolgedessen vermehrt sich der Blutphosphatasegehalt; die β -Glukosidase erscheint im Blut jedoch nicht, weil dieses Ferment in der Galle nicht vorhanden ist.

3. Bei der Nierenschädigung durch Nierengifte nimmt die Harnphosphatase zu und der Phosphatasegehalt der Niere wird

herabgesetzt. Der Phosphatasegehalt sowohl des Blutes als auch der Leber und Muskeln verändert sich nicht.

4. Es wurde eine einfache Methode der Harnphosphatasebestimmung ausgearbeitet.

LITERATUR.

- Aizawa, K. (1939): J. Biochem., **30**, 89.
- Armstrong, A. R., King, E. J. u. Harris, R. I. (1934): Canad. med. Assoc. J., **31**, 14.
- Armstrong, A. R. u. King, E. J. (1935): Canad. med. Assoc. J., **32**, 379.
- Armstrong, A. R. u. Banting, F. G. (1935): Canad. med. Assoc. J., **33**, 243.
- Bodansky, A. (1934): J. biol. Chem., **104**, 473.
- Bodansky, A. (1937): Enzymologia, **3**, 258.
- Bodansky, A. u. Jaffe, H. L. (1933-1934): Proc. Soc. exper. Biol. a. Med., **31**, 107, 1179.
- Demuth, F. (1925): Biochem. Z., **159**, 415.
- Dmochowski, A. u. Assenhajm, D. (1935): Naturw., **23**, 501.
- Freeman, S. u. Chen, Y. P. (1938): J. biol. Chem., **123**, 239.
- Freeman, S., Chen, Y. P. u. Ivy, A. C. (1938): J. biol. Chem., **124**, 79.
- Fujita, H. (1939): J. Biochem., **30**, 69.
- Greene, C. H., Shattuck, H. F. u. Kaplowitz, L. (1935): Ber. Physiol., **85**, 408.
- Herbert, F. K. (1935): Brit. J. exper. Path., **16**, 365.
- Kay, H. D. (1930): J. biol. Chem., **89**, 249.
- Kutscher, W. (1935): Z. physiol. Chem., **235**, 62.
- Ohmori, Y. (1937): Enzymologia, **4**, 217.
- Roberts, W. M. (1930): Brit. J. exper. Path., **11**, 90.
- Roberts, W. M. (1933): Brit. med. J., **1**, 734.
- Rothman, M. M., Meranze, D. R. u. Meranze, T. (1936): Amer. J. med. Sci., **192**, 526.
- Thannhauser, S. J., Reichel, M. u. Grattan, J. F. (1937): J. biol. Chem., **121**, 697.
- Thannhauser, S. J., Reichel, M., Grattan, J. F. u. Maddock, S. J. (1937): J. biol. Chem., **121**, 709.
- Thannhauser, S. J., Reichel, M. u. Grattan, J. F. (1938): Biochem. J., **32**, 1163.
- Thannhauser, S. J., Reichel, M., Grattan, J. F. u. Maddock, S. J. (1938): J. biol. Chem., **124**, 631.
- Waldschmidt-Leitz, E. u. Nonnenbruch, W. (1935): Naturw., **23**, 164.

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHEN ENZYME DES DARMSAFTES.

I. Mitteilung: Über die ereptische Wirkung des Darmsaftes.

VON

MASATAKA MATSUO.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät
der Kaiserlichen Tohoku-Universität, Sendai.
Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 22. November 1940)

In den eingehenden Untersuchungen über die tryptische und ereptische Wirkung der Auszüge aus der Pankreasdrüse und der Dünndarmschleimhaut haben Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter (1925 u. 1926) einmal keine Peptonspaltung (Pepton ex albumine, Merck) durch die von Trypsin durch Adsorption befreite Pankreas- und Darmerepsinlösung beobachtet, wohl wurde aber darauf die Spaltung von Caseino-Pepton durch die trypsinfreie Erepsinlösung von Waldschmidt-Leitz und Simons (1926) festgestellt, wie Cohnheim (1901) schon seiner Zeit beobachtet hatte. Im Darmsaft des Hundes haben Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser (1927) nur die Spaltung von Teleopepton aus Fleisch und von Dipeptiden als Erepsinspezifität bestätigt, aber weder Kinase- noch Trypsinwirkung (keine Gelatine-Spaltung?).

Bedient man sich bei der Enzymreinigung im voraus der chemischen oder physikochemischen Eingriffe wie Adsorptions- und Elutionsverfahren, so muss man wohl stets ein mögliches Wegfallen irgendeiner Aktivität bei der Behandlung in Rücksicht ziehen.

Vom Standpunkt der Verdauungsphysiologie muss also die ereptische Wirkung des sezernierten Darmsaftes noch eingehender untersucht werden. Die Frage, ob die stets in Betracht gezogenen Wirkungen der Dünndarmschleimhautmazeration sich auch noch

im sezernierten Darmsaft vorfinden, bleibt noch ungelöst, ebenso wie die Wirkungen der Pankreasmazeration hinsichtlich ihrer Übertragung auf den Pankreassaft noch einer Einschränkung bedürfen, weil im Pankreassaft Peptidasenwirkungen wie Dipeptidase- sowie Aeylasewirkung im engeren Sinne gewöhnlich vermisst wurden (Itzioka, 1936). Da über die Proteinase Wirkung des Darmsaftes an anderer Stelle berichtet werden soll, möchte Verf. hier zuerst auf das Verhalten der Peptonkörper und der Peptide im weiteren Sinne, z. B. der Acyl- und Halogenacylderivate gegenüber dem Darmsaft, der aus der am Hunde gelegten Thiry-Vellaschen Schlinge*) gewonnen wurde, und auf die Eigenschaften der Peptonase Wirkung eingehen, die er unter Leitung von Prof. Utzino studiert hat. Bei den übersichtlichen Betrachtungen sei hier hervorgehoben, dass Caseinopepton, das durch wiederholte Einwirkung der Pepsin-Salzsäure bereitete wurde und dem Teleopepton (Waldschmidt-Leitz) entsprechen mag, und auch Trypton, das auch durch wiederholte Pankreassaftwirkung (aktiviert) dargestellt wurde und der weiteren Trypsinwirkung widerstand, wie Witte-Pepton und Pepton E. Merck durch Darmsaft deutlich hydrolysiert werden (Tabelle Ia). Hier sei auch noch angeführt, dass das Trypton jedoch nicht durch Pepsin-Salzsäure angegriffen werden konnte. Während Dipeptide durch Darmsaft angreifbar sind, widerstanden alle die hier untersuchten Aeylderivate der Darmsaftwirkung; diese Beobachtung stimmt vollkommen mit derjenigen bei der Schleimhautmazeration des Dünndarms überein.

Unter den geprüften Halogenacylamino-säuren wurde nur Chloracetyl-*l*-leucin im deutlichen Grad angegriffen, während Chloracetyl-*l*-phenylalanin eine kaum merkbare $\text{NH}_2\text{-N}$ Zunahme zeigte, ebenso wie Bromisocaprylglycin und Bromisocapryldiglycin, wie schon Abderhalden und Ehrenwall (1931) die Unspaltbarkeit von Brompropionylglycin und Brompropionylglycylalanin durch die trypsinfreie Erepsinlösung gezeigt haben.

*) Herren Prof. Dr. Satake und ausserord. Prof. D. Wada im physiologischen Institut hiesiger Universität ist Verf. für die Anlegung der Darmfistel zu herzlichem Dank verpflichtet.

TABELLE I a.

Darmsaftwirkung auf Peptonkörper und Peptide.

Der frische Darmsaft wurde aus der am Hund gelegten Thiry-Vellaschen Dünndarmschlinge nach gemischter Nahrung (Reis mit Fleisch) gesammelt.

Versuchsansatz: 20 ccm 1-2%iger Peptonkörper-Phosphatpufferlösung (PH 7,8) oder 20 ccm 1/20 Mol-Substratpufferlösung (PH 7,8) wurden mit 2 ccm verdünntem Darmsaft (1 ccm Darmsaft + 1 ccm Wasser) unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert. Zur Kontrolle wurde die Enzypufferlösung ohne Substrat unter den gleichen Bedingungen digeriert. Die Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat wurde nach Sörensen und die Aminostickstoffzunahme in 1 ccm Digestat nach Van Slyke bestimmt. Die Kontrollwerte sind von den Hauptversuchswerten abgezogen und die Differenzwerte in Tabellen angegeben.

Aciditätszunahme in 5 ccm und NH₂-N Zunahme in 1 ccm Digestat

Substrate	Zeit (Std.)	0,1 n-NaOH (ccm)		NH ₂ -N (mg)	
Pepton (1%) (Peptonum siccum sine sale. Erg. B. 5, E. Merck)	5	0,30			
	24	0,70	—	—	—
	72	1,00			
Pepton (1% u. 2%) (Witte)	5	0,40	0,45	—	
	24	1,05	1,50	0,235	—
	72	1,60	2,05	0,401	
Caseino-Pepton (1%)	5	0,30			
	24	0,75	—	—	—
	72	1,15			
Caseino-Trypton (1%)	5	—			
	24	0,95	—	—	—
	72	1,35			
Gelato-Trypton (1%)	5	0,55			
	24	1,55	—	—	—
	72	1,60			
Diglycin (M/20)	5	0,35			
	24	1,30	—	—	—
	72	1,85			
dl-Leucylglycin (M/20)	5	—			
	24	0,65	—	—	—
	72	0,65			
Hippursäure (M/20) (Merck)	5	—			
	24	0,05	—	—	—
	72	0,10			

Benzoyldiglycin (M/20)	5	—		
	24	0,05		
	72	0,10	—	—
Phthalydiglycin (M/20)	5	—		
	24	—	—	0,001
	72	—	—	0,011
Chloracetyl- l-Phenylalanin (M/20)	5	—		
	24	0,10	—	0,046
	72	0,10	—	0,024
Chloracetyl-l-Leucin (M/20)	5	—		
	24	0,15	—	0,094
	72	0,45	—	0,173
dl-Bromisocapronyl- diglycin (M/20)	5	—		
	24	—	—	0,013
	72	—	—	0,031
dl-Bromisocapronyl- glycin (M/20)	5	—		
	24	—	—	0,005
	72	—	—	0,028

Abderhalden und Schwab (1929) hatten einmal darüber berichtet, dass die durch Adsorption von Trypsin befreite Erepsinlösung, die weder Casein noch Halogenacyl- α -amino-säuren (Chloracetyl-l-Leucin, -l-Leucin, -l-Phenylalanin, -l-Tyrosin oder dl-Bromisovaleryl-d-Alanin) hydrolysieren konnte, durch Zusatz einer geringen Menge Trypsin oder Trypsin-Kinase imstande sei, diese Derivate in grossem Umfang anzugreifen.

Diese Beobachtungen haben Abderhalden und Schwab (1929) veranlasst, darauf aufmerksam zu machen, dass man bei der Beurteilung der Trypsinfreiheit von Erepsinlösungen zu jener Fragestellung kommen kann, ob nicht die Erepsinlösung doch noch eine ganz geringfügige Menge von Trypsin enthält, falls eine Erepsinlösung Halogenacylaminosäuren, wenn auch unbedeutend, jedoch regelmässig anzugreifen imstande ist.

Unter diesen versuchten Halogenacylaminosäuren konnte aber nur Chloracetyl-l-Leucin durch die trypsinfreie Erepsinlösung, wie die besonders von Waldschmidt-Leitz jenen beiden Forschern überlassene, die zahlreiche andere Halogenacylaminosäuren nicht spaltete, wenn auch im schwachen Grad wie in 10% der Total-

hydrolyse, hydrolysiert werden. Diese Spaltbarkeit von Chloracetyl-*l*-Leucin (wie auch Chloracetyl-*l*-Alanin) durch die trypsinfreie Erepsinlösung wurde weiter sicher von Abderhalden und Ehrenwall (1931) bestätigt, und es wurde besonders darauf hingewiesen, dass Chloracetyl-*l*-Leucin sowohl von trypsinfreier Erepsinlösung als auch von erepsinfreier Trypsin-Kinase-Lösung gespalten wird, während Chloracetyl-*l*-tyrosin von Trypsin-Kinase, aber von trypsinfreien Erepsinlösungen in keinem Fall angegriffen wurde.

Da die Spaltung des Chloracetyl-*l*-Leucins durch Darmsaft des Hundes hier sicher festgestellt wurde, möchte man wohl eine besondere Wirkung der Darmsafthalogenacylase annehmen (Tabelle I a). Hier sei auch erwähnt, dass Chloracetyl-*l*-Phenylalanin kaum oder fast nicht durch Darmsaft, wohl aber deutlich durch die Mazeration der ausgeschalteten Dünndarmschleimhaut des Hundes

TABELLE I b.

Peptonasewirkung des Darmsaftes bei verschiedenen PH-Werten.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%iger Pepton (Witte)-Phosphatpufferlösung von verschiedenen PH-Werten (in der Tabelle angegeben + 0,5 ccm frisches Darmsaftes mit 0,5 ccm Wasser; digeriert bei 37°C unter Toluolzusatz.

Aciditätszunahme, in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)								
Zeit (Std.)	PH-Werte							
	5,0	6,0	7,0	7,5	7,8	8,0	8,5	9,0
5	0	0,12	0,15	0,17	0,15	0,15	0,15	0,08
24	0,15	0,37	0,45	0,50	0,47	0,45	0,45	0,33

angegriffen werden konnte,¹⁾ wie Itzioka (1936, 1937) andererseits die Spaltbarkeit des Chloracetyl-*l*-Phenylalanins durch Pankreassaft und durch verschiedene Gewebemazerationen des Kaninchens bestätigt hat. Bezüglich der Unterscheidung der Peptonase, der Dipeptidase und der Halogenacylase des Darmsaftes untereinander wird Näheres wohl demnächst erscheinen.

1) Vgl. dazu die folgende Mitteilung.

TABELLE II.

Peptonasewirkung des getrockneten Darmsaftes.

Versuchsansatz: 20 cem 2%iger Pepton(Witte)-Phosphatpufferlösung (PH 7,8) + 2 cem Enzymlösung + Toluol. Die hier verwendete Enzymlösung besteht aus 1 cem Darmsaft und 1 cem Wasser oder einer dieser Menge entsprechenden Trockensubstanz, die in 1 cem Wasser aufgenommen wurde. Beim Versuch (b) wurde der frische Darmsaft im Vakuumexsikkator über P_2O_5 getrocknet und wieder in der originalen Volummenge von Wasser aufgelöst.

Im Versuch (c) wurden 10 cem frischer Darmsaft des Hundes mit 30 cem Aceton versetzt und die dabei ausgeschiedene Fällung zentrifugiert und getrocknet.

Den Niederschlag hat man zuerst einmal mit 10 cem kaltem Wasser gewaschen, um den zurückgebliebenen Acetonrest zu entfernen, dann in Wasser aufgenommen und auf die originale Volummenge (10 cem) gebracht. Dieses Waschwasser zeigte eine schwache Aciditätszunahme des Peptondigestats: 24 Std. 0,15 und 72 Std. 0,35 cem 0,1 n-NaOH. Auch die Peptonasewirkung der Acetonlösung wurde geprüft, nachdem Aceton abgedampft und der Rückstand in 10 cem Wasser aufgelöst wurde (Versuch d).

Aciditätszunahme in 5 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)		
Darmsaft	24 Std.	72 Std.
a) frisch	0,70	1,30
b) Im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet	0,25	0,45
c) Acetonfällung	0,20	0,75
d) Rückstand der Acetonlösung	-0,05	-0,05

TABELLE III.

Thermostabilität des Darmsaftes.

Der frische Darmsaft wurde bei bestimmten Temperaturen während 30 Minuten lang erhitzt und dann auf seine Aktivität hin bei PH 7,8 geprüft.

Versuchsansatz: 20 cem 2%iger Pepton(Witte)-Phosphatpufferlösung (PH 7,8) + 1 cem erhitztes Darmsaftes mit 1 cem Wasser + Toluol; digeriert bei 37°C. Zur Kontrolle wurde der nicht erhitzte Darmsaft verwendet, der in Zimmertemperatur 30 Minuten lang gehalten wurde.

Aciditätszunahme in 5 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)										
Pepton (Witte)	Bad- temperatur	nicht erhitzt	40°C	50°C	60°C	70°C	75°C	80°C	90°C	100°C
	24 Std.	0,50	0,25	0,20	0,20	0,10	0	0	0	0
	72 Std.	0,70	0,70	0,40	0,30	0,10	0,10	0	0	0

Ferner wurde hier auf die Eigenschaften der Peptonasewirkung des Darmsaftes in verschiedener Hinsicht näher eingegangen, wobei zuerst die Resistenzfrage in Betracht kam. Wie schon angegeben (z. B. Waldschmidt-Leitz und Schöffner, 1926) ist Darmpeptonase auch sehr empfindlich gegenüber der Trocknung und auch bei Acetonfällung (Tabelle II).

Die gegen Hitzewirkung empfindliche Darmsaftpeptonase verlor ihre Aktivität fast ganz schon bei 70°C (30 Min.) und die Hälfte bei 50°C (Tabelle III).

Die Aufbewahrung des Darmsaftes bei saurer wie alkalischer Reaktion z. B. bei P_H 6,0 oder P_H 9,0 übt einen schädigenden Einfluss auf die Peptonasewirkung besonders in Bruttemperatur aus, während die Aktivität des Saftes, der hauptsächlich bei P_H 7,0–7,8 sogar auch im Brutschrank (1 Tag) erhalten wurde, fast uneinträchtigt bleibt (Tabelle IV).

TABELLE IV.

Säure- und Alkalibeständigkeit des Darmsaftes.

Versuchsansatz: 20 ccm 2%iger Pepton(Witte)-Phosphatpufferlösung (P_H 7,8) + 2 ccm Darmsaftlösung (1 Teil Saft + 1 Teil Wasser), die bei verschiedenen P_H -Werten nach Zusatz von verdünnter Natronlauge oder Salzsäure während 30 Minuten bei Zimmertemperatur oder 24 Stunden lang in Brutschrank gehalten und darauf neutralisiert wurde + Toluol.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)											
	Zeit (Std.)	Aufbewahrt bei P_H									
		2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	7,8	9,0	9,5	10,0
Zimmer (17°C) 30 Min.	24	-0,05	0	0	0,15	0,10	0,55	0,50	0,30	0,05	-0,10
	72	-0,05	0	0	0,40	0,45	0,65	0,85	0,40	0,15	0
Brutschrank (37°C) 24 Std.	24	—	—	—	0,05	0,15	—	0,35	-0,10	—	—
	72	—	—	—	0,40	0,40	—	0,85	-0,10	—	—

Als ein Beispiel des Enzymgiftes wurde Jodessigsäurewirkung auf Peptonase geprüft; sie blieb aber fast ohne schädigenden Einfluss und schien vielmehr etwas fördernd zu wirken (Tabelle V).

TABELLE V.

Einfluss der Monojodessigsäure auf die Peptonasewirkung
des Darmsaftes.

Versuchsansatz: 20 ccm 2%iger Pepton(Witte)-Phosphatpufferlösung (PH 7,8), welche Monojodessigsäure in verschiedenen Mol-Konzentrationen enthält + 1 ccm frisches Darmsaftes mit 1 ccm Wasser; digeriert bei 37°C unter Toluolzusatz. Zur Kontrolle wurden die Versuche mit Enzym-Puffer-Jodessigsäure ohne Substrat vorgenommen.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)

Substrat	$\text{CH}_2\text{J}\cdot\text{COOH}$ (Mol)	5 Std.	24 Std.	72 Std.
Pepton (Witte)	0	0,30	0,80	1,45
	$\frac{1}{10,000}$	0,20	0,85	1,45
	$\frac{1}{4,000}$	0,30	0,87	1,53
	$\frac{1}{2,000}$	0,35	1,00	1,78
	$\frac{1}{1,000}$	0,35	0,95	1,65
	$\frac{1}{400}$	0,27	0,85	1,50
	$\frac{1}{200}$	0,33	0,90	1,50
	$\frac{1}{100}$	0,25	0,95	1,44
	$\frac{1}{20}$	0,38	0,95	1,30

Ebenso blieb Gallenzusatz (Schweinegalle) fast ohne Wirkung auf Darmsaftpeptonase (Tabelle VI).

Die Frage, ob bei der Peptonspaltung, die durch Wiederholung maximal ausgeführt wurde, noch eine Peptidkette im Peptonhydrolysat ungespalten übrig bleibt oder nicht, ist noch nicht ganz sicher geklärt. Um darüber einen Einblick zu bekommen, wurden die Versuche vorgenommen. Nachdem man den Darmsaft wiederholt auf Peptonlösung (Witte) einwirken liess, bis die Zunahme des Aminostickstoffs kaum mehr bemerkbar war, wurde die Digestionslösung der weiteren Säurehydrolyse mit Schwefelsäure unter-

TABELLE VI.

Einfluss der Schweinegalle auf die Peptonasewirkung
des Darmsaftes.

Versuchsansatz: 20 cem 2%iger Pepton(Shiseido)-Phosphatpufferlösung (PH 7,8), welche Schweinegalle in verschiedenen Mengen enthält, wurden mit 1 cem frisches Darmsaftes versetzt und unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert. Die Gallenmenge zeigt den Volumteil derselben in 20 cem Digestionslösung.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)

Substrat	Gallenmenge	5 Std.		24 Std.		72 Std.	
Pepton (Shiseido)	0	0,23	0,10	0,63	0,50	0,78	0,65
	$\frac{1}{100}$	0,25	0,07	0,70	0,40	0,80	0,50
	$\frac{1}{50}$	0,23	0,20	0,63	0,40	0,75	0,60
	$\frac{1}{20}$	0,25	0,15	0,70	0,40	0,80	0,55
	$\frac{1}{10}$	0,20	0,18	0,70	0,40	0,80	0,55
	$\frac{1}{5}$	0,25	0,15	0,50	0,40	0,70	0,50

worfen und die Aminostickstoffmenge vor und nach der Säurehydrolyse verglichen. Die geringwertige Differenz dieser beiden Werte lässt wohl annehmen, dass der Darmsaft auf Pepton-Witte unbeschränkt, und zwar endgültig hydrolysierend einwirken kann, bis die in vitro hydrolysierbare Peptidkette kaum mehr im Peptondigestat zurückbleiben kann (Tabelle VII).

Der Einfluss der Nahrungsaufnahme auf Darmenzyme, so wie ihn die Literatur beschreibt, scheint noch nicht ganz geklärt zu sein. Zu diesen Beobachtungen in der Literatur zählen nur die Untersuchungen von Sawitsch und Krestovnikov, die von der referierenden Literatur¹⁾ übernommen worden sind. Aus einer früheren Untersuchung von Frouin (1905) geht hervor, dass die verschiedenen Nahrungsregimes keinerlei Einfluss auf die Erzeugung der Kinase haben. Nach den Angaben von Sawitsch

1) Vgl. B. P. Babkin, Die äussere Sekretion der Verdauungsdrüsen (2. Aufl., 1928), 785.

TABELLE VII.

Maximale Spaltung des Witte-Peptons durch wiederholte
Einwirkung des Darmsaftes.

100 cem 1%iger (I) oder 2%iger (II) Pepton(Witte)-Phosphatpufferlösung (PH 7,5) wurden mit je 10 cem frischem Darmsaft(Hund) unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert. In den beiden Versuchen wurde aber nicht derselbe Darmsaft angewendet. Als Kontrolle wurden 100 cem Phosphatpufferlösung (PH 7,5) mit 10 cem Darmsaft ohne Substrat geprüft. Nach bestimmten Tagen wurde die Digestionslösung für die Formoltitration abpipettiert. Nachdem die Zunahme der Acidität kaum bemerkbar geworden war, wurde die Restlösung einer weiteren Digestion unter weiterem Zusatz von 10 cem Darmsaft unter den oben angegebenen Bedingungen unterworfen. Wie die Tabelle zeigt, war bei der dritten Digestion keine Aciditätszunahme mehr bemerkbar. Darauf wurden 10 cem Digestionslösung mit 10 cem konz. H_2SO_4 vermischt und am Rückfluss während 6 Stunden hydrolysiert. Vor und nach der Hydrolyse wurde die NH_3-N in 2 cem verdünntem Hydrolysat nach Van Slyke ermittelt, nachdem das Hydrolysat unter Neutralisieren mit Alkali auf fünffache des originalen Volumens mit Wasser ergänzt wurde.

Aciditätszunahme in 4 cem (I) od. in 5 cem (II) (in cem 0,1 *n*-NaOH)

Zeit(Tage)	I) 1% Peptonlösung			II) 2% Peptonlösung		
	Hauptversuch	Kontrolle	Zunahme	Hauptversuch	Kontrolle	Zunahme
erster Darmsaftzusatz						
Sofort	0,80	0,35	—	1,50	0,45	—
2	2,20	0,35	1,40	—	—	—
3	2,50	0,35	1,70	4,70	0,45	3,20
4	2,60	0,40	1,75	5,00	0,45	3,50
6	—	—	—	5,35	0,50	3,80
10	—	—	—	5,60	0,50	4,05
12	—	—	—	5,70	0,50	4,15
zweiter Darmsaftzusatz						
Sofort	2,30	0,40	—	5,35	0,60	—
1	2,40	0,45	0,05	—	—	—
2	2,55	0,45	0,20	—	—	—
3	2,55	0,45	0,20	—	—	—
4	—	—	—	5,45	0,65	0,05
dritter Darmsaftzusatz						
Sofort	2,40	0,50	—	5,05	0,65	—
2	2,45	0,55	0	—	—	—
3	—	—	—	5,10	0,70	0
NH_3-N Zunahme in 2 cem verd. Hydrolysat (mg)						
vor	0,467	0,197	—	0,589	0,242	—
nach Hydrolyse	0,494	0,212	0,012	0,698	0,334	0,017

TABELLE VIII.

Darmsaftwirkung nach Fleischnahrung.

Versuchsansatz: 20 ccm 2%iger Eiweiss- oder 1/20 Mol-Substrat-Phosphatpufferlösung (Ph 7,8) + 2 ccm verdünnter Darmsaft (1 Teil Saft + 1 Teil Wasser) + Toluol; digeriert bei 37°C. Der Saft wurde 2 und 4 Stunden nach der Fleischnahrung gewonnen und dann untersucht. Der Darmsaft wurde aber bei a) 24 Std. lang in der Eiskammer, bei b) im Brutschrank, bei c) 72 Std. lang im Brutschrank und bei d) 5 Tage lang im Eisschrank aufbewahrt.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)

Substrate	Saftaufnahme 2 Std. nach Fleischnahrung		Saftaufnahme 4 Std. nach Fleischnahrung	
	24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.
2% Casein (Hammarsten)	0	0,05	0 a) 0,15 b) 0,05	0,05 0,15 0,05
„ Gelatine	0	0,05	0 a) 0,10 b) 0,05	0,10 0,10 0,15
„ Fibrin	0	0,10	—	—
„ Pepton (Witte)	0,95	1,45	0,40 a) 0,50 b) 0,40 c) 0,25 d) 0,35	1,00 1,25 0,95 0,50 0,60
M/20 Diglycin	0,70	1,40	—	—
„ Hippursäure	0,05	0,10	—	—
„ Benzoyldiglycin	-0,05	-0,05	—	—

(1921) und von Krestovnikov (1924) sollte die Produktion von Erepsin durch die Produkte der peptischen und insbesondere der tryptischen Verdauung hervorgerufen werden, während Magensaft, Öl, Galle, Milch und Stärke in dieser Hinsicht unwirksam waren und ausserdem der Pankreassaft als Reiz für die Erepsinproduktion wirken konnte. So ergab es sich dabei, dass der Pankreassaft als allgemeiner Reiz für beinahe alle Fermente des Darmsaftes wirkt.

Da hier hinsichtlich der spezifischen Erepsinwirkung des Darmsaftes verschiedene angreifbare wie auch resistente Substrate geprüft werden konnten, hat man zuletzt den Einfluss der Nah-

TABELLE IX.

Darmsaftwirkung nach Fettnahrung.

Versuchsaussatz: 20 ccm 2%iger Eiweiss- oder M/20-Substrat-Phosphat-pufferlösung (PH 7,8) + 2 ccm verdünnter Darmsaft (1 Teil Saft + 1 Teil Wasser) + Toluol; digeriert bei 37°C. Der Saft wurde 2 und 4 Stunden nach der Fettnahrung gewonnen und geprüft. Der Saft wurde bei a) 24 Std. lang in der Eiskammer und bei b) im Brutschrank aufbewahrt.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)				
Substrate	Saufnahme 2 Std. nach Fettnahrung		Saufnahme 4 Std. nach Fettnahrung	
	24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.
2% Casein (Hammarsten)	—	—	0,05	0,15
			a) 0	0
			b) 0,05	0,10
„ Gelatine	—	—	0,05	0,10
			a) 0,05	0,15
			b) 0	0,05
„ Pepton (Witte)	0,85	1,30	0,35	1,40
			a) 0,45	1,15
			b) 0,35	1,00
M/20 Diglycin	0,65	1,35	—	—
„ Hippursäure	0	0	—	—
„ Benzoyldiglycin	0,05	0,05	—	—

rungsaufnahme auf die Darmerepsinwirkung untersucht und das Ergebnis war, dass nach Fleisch-, Fett- und Reishahrung kein Unterschied in der Erepsinwirkung des Darmsaftes beobachtet wurde, der 2 Stunden oder 4 Stunden nach der Probenahrung gewonnen wurde. Die Substrate, die schon eine Resistenz der Darmerepsinwirkung gegenüber zeigten, konnten nie durch besondere Nahrungsaufnahme enzymatisch zugänglich gemacht werden. Die Aktivität, des Saftes, welcher später nach der Nahrungsaufnahme (4 Stunden) gesammelt wurde, schien im allgemeinen etwas schwächer zu werden und die Wirkung der Peptonase wird durch die Aufbewahrung während 72 Stunden im Brutschrank wie auch während 5 Tagen im Eisschrank ziemlich beeinträchtigt (Tabelle VIII, IX u. X).

TABELLE X.

Darmsaftwirkung nach Reinsnahrung.

Versuchsansatz: 20 ccm 2%iger Substrat-Phosphatpufferlösung (Ph 7,8) + 2 ccm verdünnter Darmsaft (1 Teil Saft + 1 Teil Wasser) + Toluol; digeriert bei 37°C. Der Saft 4 Stunden nach der Reinsnahrung gewonnen und dann gebraucht, aber a) 24 Stunden lang in der Eiskammer und bei 2) im Blutschrank aufbewahrt.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)						
Substrate			a		b	
	24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.
Casein (Hammarsten)	0	0	-0,05	0,05	0	0,10
Gelatine	-0,05	-0,10	0	0,15	0,05	0,10
Pepton (Witte)	0,40	0,90	0,35	0,85	0,30	0,85

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Im Darmsaft, der durch die Thiry-Vellasche Schlinge des Hundes gewonnen wurde, hat man die Peptonasewirkung, die Dipeptidase- und eine besondere Halogenacylasewirkung für Chloracetyl-*L*-Leucin festgestellt, die Acylase- und Carboxypolypeptidasewirkung (Hippursäure-, Phthalyl- oder Benzoyldiglycin) aber nicht.

2. Die Peptonasewirkung des Darmsaftes, die bei Ph 7,5-7,8 am günstigsten auftrat, ist empfindlich gegen Trocknung, Acetonfällung und auch Hitze, und zwar verlor sie ihre Aktivität bei 70°C (30 Min.). Durch Aufbewahrung bei entweder saurer oder alkalischer Reaktion, besonders im Brutschrank, wurde die Wirkung beeinträchtigt, die aber bei Ph 7,8 ziemlich gut erhalten blieb.

3. Galle und Jodessigsäure bleiben fast ohne Einfluss auf Darmpeptonase.

4. Die proteolytische Wirkung des Darmsaftes wurde durch verschiedene Nahrungsaufnahme z. B. Fleisch-, Fett- oder Kohlehydratnahrung nicht besonders beeinflusst.

5. Nach der wiederholten Einwirkung des Darmsaftes auf Witte-Pepton hat man fast keine durch Mineralsäure hydrolysierbare Peptidkette im Digestat bestätigt und die Annahme liegt sehr nahe, dass Darmsaft auf Pepton fast unbeschränkt einwirken kann.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Ehrenwall, E. v. (1931): *Fermentf.*, **12**, 223 u. 376.
Abderhalden, E. u. Ehrenwall, E. v. (1931): *ibid.*, **12**, 376.
Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1929): *ibid.*, **10**, 440.
Cohnheim, C. (1901): *Z. f. physiol. Chem.*, **33**, 451.
Frouin, A. (1905): *Cpt. r. d. scéances d. la soc. biol.*, **58**, 1025.
Itzioka, F. (1936): *Dieses Journ.*, **24**, 139 u. 267.
Itzioka, F. (1936): *Kagaku-Kenkyusho Kooenshuu*, **6**, 67 u. 72, (1937): *ibid.*, **7**, 224.
Krestovnikov, A. (1924): *Bull. de l'inst. Lesshaft*, **8**, 345 (zitiert nach Babkin).
Sawitsch, W. W. (1921): *ibid.*, **3**, 241 (zitiert nach Babkin).
Waldschmidt-Leitz, E. u. Harteneck, A. (1925): *Z. f. physiol. Chem.*, **149**, 203.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Schäffner, A. (1926): *ibid.*, **151**, 31.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Simons, E. (1926): *ibid.*, **156**, 99.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Waldschmidt-Graser, J. (1927): *ibid.*, **166**, 241.

ÜBER DIE IM TIERKÖRPER STATTFINDENDEN VERÄNDERUNGEN DER AN N SUBSTITUIERTEN AMINOSÄUREN.

5. Mitteilung: Verhalten des N-Methylphenylalanins im Kaninchenorganismus.

VON

SEN-DEN FUKUYAMA.

*(Aus dem Med.-chem. Laboratorium der Medizinischen Schule,
angegliedert an die Kaiserliche Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. R. Hirohata.)*

(Eingegangen am 24. November 1940)

Um das Schicksal der im Tierkörper eingeführten an N substituierten Aminosäure zu verfolgen, wurden schon einige Experimente in unserem Laboratorium durchgeführt. Hirohata (1936–37) und Chin Kyu-sui (1938) haben aus dem Harn des mit Abrin vorbehandelten Kaninchens Kynurenin und Kynurensäure isoliert. Später hat in gleicher Weise Tai-sei Tō (1939) mit O,N-Dimethyltyrosin *p*-Methoxyphenylbrenztraubensäure und *d*-Dimethyltyrosin getrennt.

Durch diese Experimente ist es so gut wie bestätigt, dass die Methylderivate der cyclischen Aminosäuren wie die natürliche Aminosäure im Tierorganismus desaminiert wird, obwohl der Weg solcher Umwandlung noch nicht aufgeklärt ist. Nun war es für uns von höchstem Interesse, zu prüfen, ob N-Methylphenylalanin unter denselben Bedingungen auch desaminiert werden kann, so dass die dabei gebildete Phenylbrenztraubensäure im Harn ausgeschieden wird.

Das in diesen Versuchen gebrauchte *dl*-N-Methylphenylalanin wurde durch Verkoppelung von Benzaldehyd mit Kreatinin bzw. Methylhydantoin, nachfolgende Reduktion und Hydrolyse der resultierenden Verbindungen dargestellt. Die racemische Säure verlässt den Kaninchenorganismus zum Teil als unveränderte

Säure, zum grössten Teil aber wird sie asymmetrisch gespalten und desaminiert, so dass *d*-Säure und Phenylbrenztraubensäure zur Ausscheidung gelangen.

Mit dieser Substanz hatten schon früher F. Knoop und H. Oesterlin (1927) Versuche an Hunden vorgenommen, aber sie haben nur unveränderte Säure und vermehrte Benzoessäure festgestellt. Vor kurzem, während die vorliegenden Untersuchungen im Gang waren, haben H. E. Carter und P. Handler (1939) mitgeteilt, dass die *d*-Form keine wachstumsfördernde Wirkung gegenüber der *l*-Form des N-Methylphenylalanins hatte. Aber ihre Untersuchungen waren nicht auf die Verfolgung der Stoffwechselprodukte eingestellt.

EXPERIMENTELLES.

A. Darstellung des N-Methylphenylalanins.

a) Aus Methylhydantoin und Benzaldehyd:

1) *Kondensation von Methylhydantoin mit Benzaldehyd zu 1-Methyl-5-Benzalhydantoin.* 38,0 g Methylhydantoin werden mit 35,0 g Benzaldehyd gut gemischt, mit 42,9 g trockenem Natriumacetat und 104 ccm Essigsäureanhydrid versetzt und 4 Stunden im Ölbad auf 105–120°C erhitzt. Nach dem Erkalten wird die feste Reaktionsmasse mit warmem Wasser, dann mit gekühltem Alkohol sorgfältig gewaschen. Die Ausbeute an schönen gelben Krystallen beträgt 53,6 g, entspricht also 80% d. Th..

Die Substanz schmilzt bei 193–4°C und ist leicht löslich in Alkohol und Äther, kaum in Wasser.

$C_{11}H_{10}O_2N_2$ Ber. N 13,87 Gef. N 13,78

2) *1-Methyl-5-benzylhydantoin.* Man löst 50 g 1-Methyl-5-Benzalhydantoin in 4000 ccm 0,5*n*-Natronlauge und lässt die Lösung 6 Stunden lang mit 2,5%igem Natriumamalgam unter stetem Umrühren stehen. Die anfangs braune Flüssigkeit wird zum Schluss farblos. Die Reaktionsflüssigkeit wird vom Quecksilber getrennt, unter Kühlung mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und eingeeengt. Die dabei ausgeschiedenen weissen

nadelförmigen Krystalle wiegen 45 g (etwa 90% d. Th.).

Sie schmelzen bei 106°C und sind leicht löslich in Alkohol, etwas schwerer in Wasser und Äther.



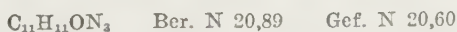
3) *dl-N-Methylphenylalanin*. 40 g 1-Methyl-5-Benzylhydantoin werden mit 400 g Baryt und 600 ccm Wasser versetzt und 12 Stunden auf dem Sandbad verseift. Zur Isolierung der Aminosäure wird die Reaktionsflüssigkeit mit Schwefelsäure genau neutralisiert, filtriert und das farblose Filtrat eingengt und abgekühlt. Die Ausbeute beträgt 25 g, entspricht mithin 75% d. Th..

Die Substanz krystallisiert in dreieckige Blättchen, zersetzt sich bei 254°C und ist in organischen Lösungsmitteln ziemlich schwer löslich. Sie löst sich in etwa 60 fachem Volumen Heisswasser. Die Ninhydrin-Reaktion fällt erst nach längerem Erhitzen, die Xanthoprotein-Reaktion dagegen sofort positiv aus. Das Kupfersalz ist blassviolett, löslich in heissem Alkohol, kaum aber in Wasser.



b) *Aus Kreatinin und Benzaldehyd*.

1) *Kondensation von Kreatinin mit Benzaldehyd zu 5-Benzalkreatinin*. 28,3 g Kreatinin werden mit 26,5 g Benzaldehyd gut gemischt und mit 15 g trockenem Natriumacetat und 200 ccm Essigsäureanhydrid versetzt, 90 Minuten im Ölbad auf 130–140°C erhitzt. Nach dem Erkalten wird die feste Reaktionsmasse mit warmem Wasser, dann vorsichtig mit gekühltem Alkohol gewaschen. Die Ausbeute an schönen gelben Krystallen beträgt 45 g, entspricht mithin 90% d. Th.. Die Substanz zersetzt sich bei 244°C und ist löslich in Alkohol und Äther, kaum in Wasser.



2) *5-Benzylkreatinin*. Man löst 40 g Benzalkreatinin in 4000 ccm 0,5*n*-Natronlauge und lässt es 6 Stunden lang mit 2,5%igem Natriumamalgam unter stetem Umrühren stehen. Die anfangs braune Flüssigkeit wird zum Schluss farblos. Man giesst die

Reaktionsflüssigkeit vom Quecksilber ab und neutralisiert sie unter Kühlung mit verdünnter Schwefelsäure. Das Gewicht der beim Einengen ausgeschiedenen weissen Krystalle beträgt 36,5 g (90% d. Th.). Die Krystalle schmelzen bei 282°C unter geringer Zersetzung und sind löslich in Alkohol, schwer in Wasser.



3) *dl-N-Methylphenylalanin*. 30 g Benzylkreatinin werden mit 400 g Baryt und 600 ccm Wasser versetzt und 12 Stunden auf dem Sandbad verseift. Aus der Verseifungsflüssigkeit erhält man *dl-N-Methylphenylalanin*, das denselben Zersetzungspunkt besitzt wie das aus dem Benzylhydantoin hergestellte *dl-N-Methylphenylalanin*. Die Ausbeute beträgt 18,5 g und entspricht 70% d. Th..

B. Versuche an Kaninchen.

Versuch 1. 2 Kaninchen erhielten an drei aufeinander folgenden Tagen je 2,0 g *dl-N-Methylphenylalanin* unter die Haut. Die Tiere haben es anstandslos vertragen. Der während 6 Tagen angesammelte Harn wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther 3 Tage lang extrahiert (Ätherfraktion), danach mit Baryt neutralisiert und eingengt (Wasserfraktion).

a) *Ätherfraktion*. Der Ätherrückstand enthielt nur eine geringe Menge von Hippursäure. Keine Krystalle von Phenylbrenztraubensäure liessen sich isolieren. Sie verriet sich nur durch die spurweise Eisenchlorid-Reaktion.

b) *Wasserfraktion*. Nach dem Einengen wurde der Harn mit Kupfercarbonat gekocht, dabei schieden sich blassviolette Krystalle aus. Nach Entfernung des Kupfers wurden 0,8 g weisse Krystalle gewonnen. Sie zersetzten sich bei 254°C, wiesen sofort die Xanthoprotein-Reaktion auf, die Ninhydrin-Reaktion aber erst nach längerem Erhitzen, und zeigten keine Drehung. Durch ihre Eigenschaften und die Analyse wurden sie als *dl-N-Methylphenylalanin* identifiziert.



Nach dem Absaugen des Kupfersalzes von *dl*-Säure wurde die

tiefblaue Mutterlauge eingeengt. Dabei schieden sich nadelförmige tiefblaue Krystalle aus. Sie waren leicht löslich in Wasser und Alkohol. Nach Entfernung des Kupfers wurden nadelförmige weisse Krystalle in einer Menge von 1,66 g gewonnen. Sie zersetzten sich bei 260°C, und waren linksdrehend, leichter löslich in Wasser als *dl*-N-Methylphenylalanin und von süßem Geschmack; in Alkohol und Äther waren sie unlöslich. Sie gaben erst nach längerem Erhitzen die Ninhydrin-Reaktion, sofort aber die Xanthoprotein-Reaktion. Ihre Eigenschaften und die Analyse stellten sie als *d*-N-Methylphenylalanin fest.



Spezifische Drehung in 5%iger Schwefelsäure beträgt,

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{1,47 \times 100}{2 \times 6,9865} = (+)10,52^\circ.$$

Versuch 2. 3 Kaninchen erhielten an vier aufeinander folgenden Tagen je 1,0 g *dl*-N-Methylphenylalanin unter die Haut. Aus dem gesammelten Harn liessen sich 1,90 g *d*-N-Methylphenylalanin und 0,1 g *dl*-N-Methylphenylalanin isolieren, aber keine Phenylbrenztraubensäure. Die Letztere entzieht sich dem Nachweis selbst durch die Eisenchlorid-Reaktion.

Versuch 3. 2 Kaninchen erhielten in einem Tage je 5,0 g *dl*-N-Methylphenylalanin in 3 Portionen mit 3 stündigem Intervall unter die Haut. Die Tiere haben es ganz anstandslos vertragen. Aus dem in 72 Stunden entleerten Harn liessen sich 1,5 g *dl*-N-Methylphenylalanin und 0,5 g *d*-N-Methylphenylalanin isolieren. Der Ätherrückstand enthielt nur eine sehr geringe Menge von Krystallen. Sie färbten sich beim Zusatz von Eisenchlorid grün und bildeten mit Dinitrophenylhydrazin eine schwer lösliche Verbindung von Schmelzpunkt 150°C. Sie wurden durch ihre Eigenschaften als Phenylbrenztraubensäure erkannt und wogen als Dinitrophenylhydrazon 80 mg.



Nr.	Verbreichungs- weise	Verabreichtes <i>dl-N</i> -Methyl- phenylalanin (g)	Phenylbrenztraubensäure		Unverändertes <i>dl-N</i> -Methyl- phenylalanin (g)	<i>d-N</i> -Methyl- phenylalanin (g)
			Eisenchlorid- Reaktion	Dinitrophenyl- hydrazon (mg)		
1	2 Kaninchen, auf 3 Tagen verteilt	12	±		0,8	1,66
2	3 Kaninchen, auf 4 Tage verteilt	12	-		0,1	1,90
3	2 Kaninchen, an einem Tag	10	+	80	1,5	0,50

SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Nach Verabreichung von *dl*-N-Methylphenylalanin schieden die Kaninchen im Harn Phenylbrenztraubensäure aus, womit sicher bewiesen ist, dass das *dl*-N-Methylphenylalanin im Kaninchenorganismus wie eine natürliche Aminosäure desaminiert wird.

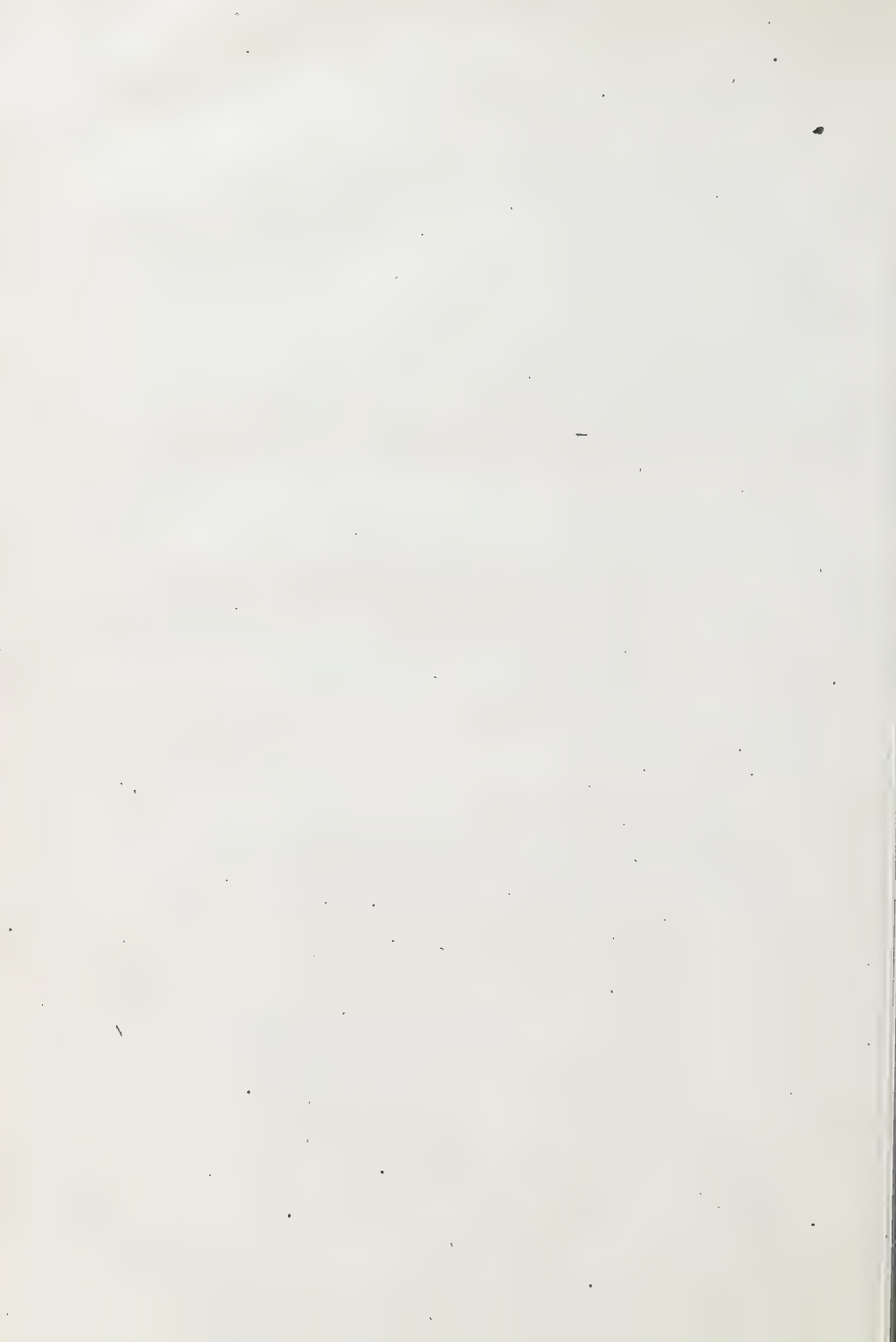
2. Das in dem Kaninchenorganismus eingeführte *dl*-N-Methylphenylalanin wird dort zum grössten Teil asymmetrisch abgebaut, und zwar wird die *l*-Säure nach Umwandlung in Phenylbrenztraubensäure, die *d*-Säure dagegen ohne weitere Veränderung im Harn ausgeschieden.

3. Gegenüber der *p*-Methoxyphenylbrenztraubensäure ist die Phenylbrenztraubensäure einer Umwandlung so zugänglich, dass sie im Harn in kleinster Menge ausgeschieden wird, und zwar wenn das *dl*-N-Methylphenylalanin in reichlicher Menge und in kurzen Intervallen verabreicht wird.

4. Der Chemismus der Desaminierung, ob es sich um das Abstossen der N-Methylgruppe allein, oder um die oxydative Demethylaminierung handelt, bleibt noch unklar.

LITERATUR.

- Carter, H. E. & Handler, P. (1939): Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **41**, 347.
Chin, K. (1938): Z. physiol. Chem., **257**, 12.
Hirohata, R. (1936, 1937): Vorträge vor der 9. und 10. Hauptversammlung der Japanischen Biochemischen Gesellschaft.
Knoop, F. u. Oesterlin, H. (1927): Z. physiol. Chem., **170**, 186.
Tō, T. (1939): Z. physiol. Chem., **260**, 175.



BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UNVERSEIFBAREN SUBSTANZEN.

V. Mitteilung.

Über den Einfluss des Vitamin B₁ auf den Gehalt der Nebenniere an unverseifbarer Substanz.

VON

KINZO ARAI.

(Aus dem mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1940)

EINLEITUNG.

Beznak (1923) und Schmitz (1927) haben in Versuchen eindeutig bewiesen, dass bei B-Avitaminose es zur Hypertrophie der Nebennieren kommt.

Lawaczek (1923) hat bei B-Avitaminose der Tiere die Zunahme des Cholesteringehaltes in den verschiedenen Geweben beobachtet; eine solche wurde später auch von Hotta (1924), Kodama (1925) und Milbradt (1930) bestätigt. Nach Hotta nimmt dabei der Cholesteringehalt der Nebenniere gegenüber den anderen Geweben ab. Nach Verzar und Peter (1924) wird bei B-Avitaminose die Veresterung des Cholesterins in der Nebenniere gestört.

Aus obigen Tatsachen geht hervor, dass die Nebenniere innige Beziehung zum Cholesterinstoffwechsel hat, indem bei Mangel an Vitamin B ihre funktionellen Verhältnisse in gewissem Masse gestört zu werden scheinen.

Das veranlasste mich, die Beziehungen zwischen der Schwankung des Cholesteringehaltes in der Nebenniere und Vitamin B₁ noch eingehender zu untersuchen und zugleich auch die Bestimmung der Schwankung der unbekannten unverseifbaren Substanz (U.S.), welche nach Kimizuka (1938) zum Cholesteringehalt

innige Beziehung hat, vorzunehmen.

VERSUCHSMETHODE UND MATERIAL.

Als Versuchstiere dienten etwa 1,5 kg schwere Hühner, denen zur Herbeiführung einer B-Avitaminose täglich die Kost von folgender Zusammensetzung verabreicht wurde:

Polierter Reis	70 g,
Kasein	15 g,
Salz (McCollum)	3 g,

Nachdem die unverseifbare Substanz mit Kumagawa-Suto'scher Fett-Bestimmungsmethode (1908) bestimmt war, wurde das darin befindliche Cholesterin mit Liebermann-Burchard'scher Methode gewogen. Die Differenz, welche man durch Abziehen der Cholesterinmenge von der Menge der unverseifbaren Substanz erhält, stellt die Menge der U.U.S. dar.

Versuch I.

Tabelle I zeigt die Ergebnisse bei der Bestimmung von Cholesterin und U.U.S. in der Nebenniere bei normalen Hühnern.

TABELLE I.

Nr.	unverseif. Subst.		Cholesterin		U. U. S.	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	2,9	2,70	2,1	1,96	0,8	0,74
2	3,3	2,52	2,5	1,91	0,8	0,61
3	3,4	2,81	2,2	1,82	1,2	0,99
4	3,4	4,12	1,9	2,30	1,5	1,81
5	6,6	2,93	5,6	2,49	1,0	0,44
Mittel	3,9	3,02	2,9	2,09	1,1	0,92

Versuch II.

Tabelle II zeigt die Ergebnisse bei der Bestimmung von Cholesterin und U.U.S. in der Nebenniere der Hühner, bei denen mit oben erwähneter Diät die B-Avitaminose herbeigerführt worden war.

TABELLE II.

Nr.	unverseif. Subst.		Cholesterin		U. U. S.	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	1,9	0,88	1,2	0,54	0,7	0,34
2	2,5	1,26	1,5	0,75	1,0	0,51
3	3,1	1,37	1,9	0,83	1,2	0,54
Mittel	2,7	1,17	1,5	0,71	0,9	0,46

Wie die Ergebnisse in Tabelle I und II zeigen, ist die unverseifbare Substanz der Nebenniere, welche bei normalen Tieren durchschnittlich 3,02% ergibt, bei B-Avitaminose auf 1,17% deutlich absunken. Der Cholesteringehalt beträgt bei normalen Tieren 2,09%, bei B-Avitaminose 0,71% im Durchschnitt; die U.U.S. bei normalen Tieren 0,92%, bei B-Avitaminose 0,46% im Durchschnitt. Die obigen Ergebnisse legen also dar, dass bei B-Avitaminose sowohl das Cholesterin wie auch die U.U.S. an Menge abnehmen.

Da fernerhin bei B-Avitaminose die Nebenniere eine Hypertrophie erfährt, wurde die absolute Menge von Cholesterin und U.U.S. mit derjenigen bei normalen Tieren verglichen; dabei zeigte sich, dass auch bei B-Avitaminose, wie die Ergebnisse in Tabelle I und II zeigen, eine Abnahme stattfindet.

Versuch III.

Nachdem im zweiten Versuch festgestellt worden war, dass es in der Nebenniere der Hühner mit polierter Reismahrung zur Abnahme des Cholesteringehaltes kommt, sollte der nächste Versuch feststellen, ob diese Abnahme auf den Mangel an Vitamin B zurückzuführen ist. Es wurde den Hühnern neben der 20 tägigen obenerwähnten Reiskost Vitamin B₁ (Oryzanin) täglich (je 16 Taubeneinheiten) verabfolgt und, wie im vorigen Versuch, die unverseifbare Substanz gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle III.

Nach den Ergebnissen in Tabelle III beträgt die unverseifbare Substanz 3,04%, das Cholesterin 2,06% und die U.U.S. 0,99% Durchschnitt. Diese Menge entspricht der bei normalen Tieren.

TABELLE III.

Nr.	unverseif. Subst.		Cholesterin		U. U. S.	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	3,5	2,40	2,5	1,71	1,0	0,68
2	3,8	3,41	2,6	2,33	1,2	1,07
3	5,7	3,31	3,6	2,09	2,1	1,22
Mittel	4,3	3,04	2,9	2,06	1,4	0,99

Hiernach ist also keine Abnahme des Cholesteringehaltes und der U.U.S. in der Nebenniere des Huhnes mit polierter Reisdät zu beobachten, wenn ihm Vitamin B₁ verabfolgt wird.

Aus obiger Tatsache lässt sich schliessen, dass die Abnahme des Cholesterins und der U.U.S. in der Nebenniere bei Reisdahrung auf den Vitamin B₁-Mangel zurückzuführen ist.

Versuch IV.

Wie die obigen Versuche gezeigt haben, kommt es durch Vitamin B₁-Mangel zur Abnahme des Cholesterins und der U.U.S. in der Nebenniere des Huhnes. Nach den Versuchen von Kimizuka (1938) führt die Darreichung von Cholesterin in Kaninchen zur Zunahme des Cholesteringehaltes und der U.U.S. in den verschiedenen Geweben. Um nun zu untersuchen, ob das Cholesterin und die U.U.S. zunehmen, wenn den Versuchstieren das Cholesterin zugeführt wird, wurde ihnen, wie im vorigen Versuch, neben der polierten Reisdahrung das Cholesterin je 0,3 g täglich gegeben und am 20. Tage der Fütterung die Bestimmung des Cholesterins und der U.U.S. in der Nebenniere vorgenommen. Diese Ergebnisse zeigt die Tabelle IV.

Wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist, beträgt bei täglicher Verabfolgung des Cholesterins neben der polierten Reiskost die unverseifbare Substanz 1,05%, das Cholesterin 0,67% und die U.U.S. 0,37% im Durchschnitt; die ermittelten Werte sind demnach nahezu dieselben wie bei alleiniger polierten Reisdahrung. Es konnte selbst bei der Darreichung des Cholesterins keine Zunahme derselben Substanz in der Nebenniere beobachtet werden, und auch

TABELLE IV.

Nr.	unverseif. Subst.		Cholesterin		U. U. S.	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	1,7	0,81	1,0	0,48	0,7	0,33
2	1,9	1,11	1,1	0,64	0,8	0,46
3	3,4	1,24	2,5	0,91	0,9	0,32
Mittel	2,3	1,05	1,5	0,67	0,8	0,37

bezüglich der absoluten Menge wurden die gleichen Ergebnisse gewonnen.

Versuch V.

Im vierten Versuch wurde festgestellt, dass selbst die Darreichung des Cholesterins bei B-Avitaminose die Zunahme von Cholesterin und U.U.S. in der Nebenniere des Tieres nicht herbeizuführen vermag. Es wurde nun den Tieren Vitamin B₁ zugeführt, um zu entscheiden, wieweit sich sein Einfluss geltend macht. Der Versuch wurde ganz gleich dem vierten Versuch durchgeführt, aber den Tieren Vitamin B₁ täglich (je 16 Taubeneinheiten) verabfolgt und nach 20 tägiger Darreichung die Bestimmung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle V wiedergegeben.

TABELLE V.

Nr.	unverseif. Subst.		Cholesterin		U. U. S.	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	10,7	5,83	8,4	4,80	2,3	1,02
2	6,6	4,32	5,0	3,27	1,6	1,04
3	5,5	3,18	4,2	2,34	1,3	0,83
4	5,4	4,96	4,3	3,97	1,1	0,99
Mittel	7,1	4,47	5,5	3,59	1,6	0,97

Nach den Ergebnissen in Tabelle V ist der Mittelwert (4,47%) der unverseifbaren Substanz höher als der (3,02%) bei normalen Tieren, und weitaus höher als 1,05% in dem Falle der B₁-

Avitaminose, bei welchem Cholesterin dargereicht wurde.

Auch bei Cholesterin ist der Durchschnittswert (3,59%) höher als der (2,09%) bei normalen Tieren, er erreicht tatsächlich die fünffache Menge von 0,67% in dem Falle der B₁-Avidaminose, bei welchem Cholesterin zugeführt wurde.

Die U.U.S. beträgt durchschnittlich 0,97% und stimmt beinahe mit der bei normalen Tieren überein, erreicht aber die dreifache Menge von 0,37% in dem Falle der B₁-Avidaminose, bei welchem Cholesterin dargereicht wurde.

Aus den obigen Ergebnissen geht hervor, dass die Abnahme des Cholesterins und der U.U.S. in der Nebenniere, welche bei polierter Reiskost herbeigeführt wird, sogar bei der Cholesterindarreichung keine Zunahme erfährt, aber bei gleichzeitiger Vitamin B₁-Zufuhr die Menge der beiden Substanzen in hohem Masse zunimmt.

Nach den Versuchen von Hotta(1924) kommt es zur Zunahme des Cholesterins in der Nebenniere, wenn bei Bestehen der B-Avidaminose das Cholesterin verabreicht wird. Das rührt möglicherweise daher, dass in der dabei verfütterten Nahrung noch etwas Vitamin B₁ enthalten gewesen ist, weil die Lebenstage der von ihm für die Versuche verwendeten 12 Hühner 23 Tage (1 Fall), 24 Tage (2 Fälle) und über 27 Tage (übrige Fälle) betragen; bei 4 Fällen davon betragen sie sogar 38–43 Tage. Nach meinen Ergebnissen ist dies eine Erscheinung, welche bei der Nahrung mit einer gewissen Menge Vitamin B₁ entsteht, weil die Lebensdauer der Hühner bei B₁ freier Nahrung meistens 14–25 Tage betragen. Folglich dürfte die in seinen Versuchen beobachtete Zunahme des Cholesterins in der Nebenniere auf dieser geringen Menge des Vitamins B₁ zurückzuführen zu sein.

Aus obigen Tatsachen geht eindeutig hervor, dass das Cholesterin und die U.U.S. in der Nebenniere bei B₁-Avidaminose abnehmen, und durch die Cholesterinzufuhr nicht zunehmen. Die Zunahme zeigt sich erst dann, wenn mit Cholesterin zugleich Vitamin B₁ zugeführt wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die obigen Ergebnisse führen zu folgender Schlussfolgerung.

1. Wird die Menge der unverseifbaren Substanz der Nebenniere des B₁-avitaminosen Huhnes in Cholesterin und unbekannte unverseifbare Substanz (U.U.S.) eingeteilt bestimmt, so zeigt sich eine deutlichere Abnahme im Vergleich mit der bei normalen Tieren.

2. Bei täglicher Darreichung von Vitamin B₁ findet dabei die oben erwähnte Abnahme nicht statt.

3. Das Cholesterin und die U.U.S. in der Nebenniere erfahren eine Abnahme, selbst wenn das Cholesterin (täglich 0,3 g) zu der B₁-avitaminosen Nahrung zugefügt wird.

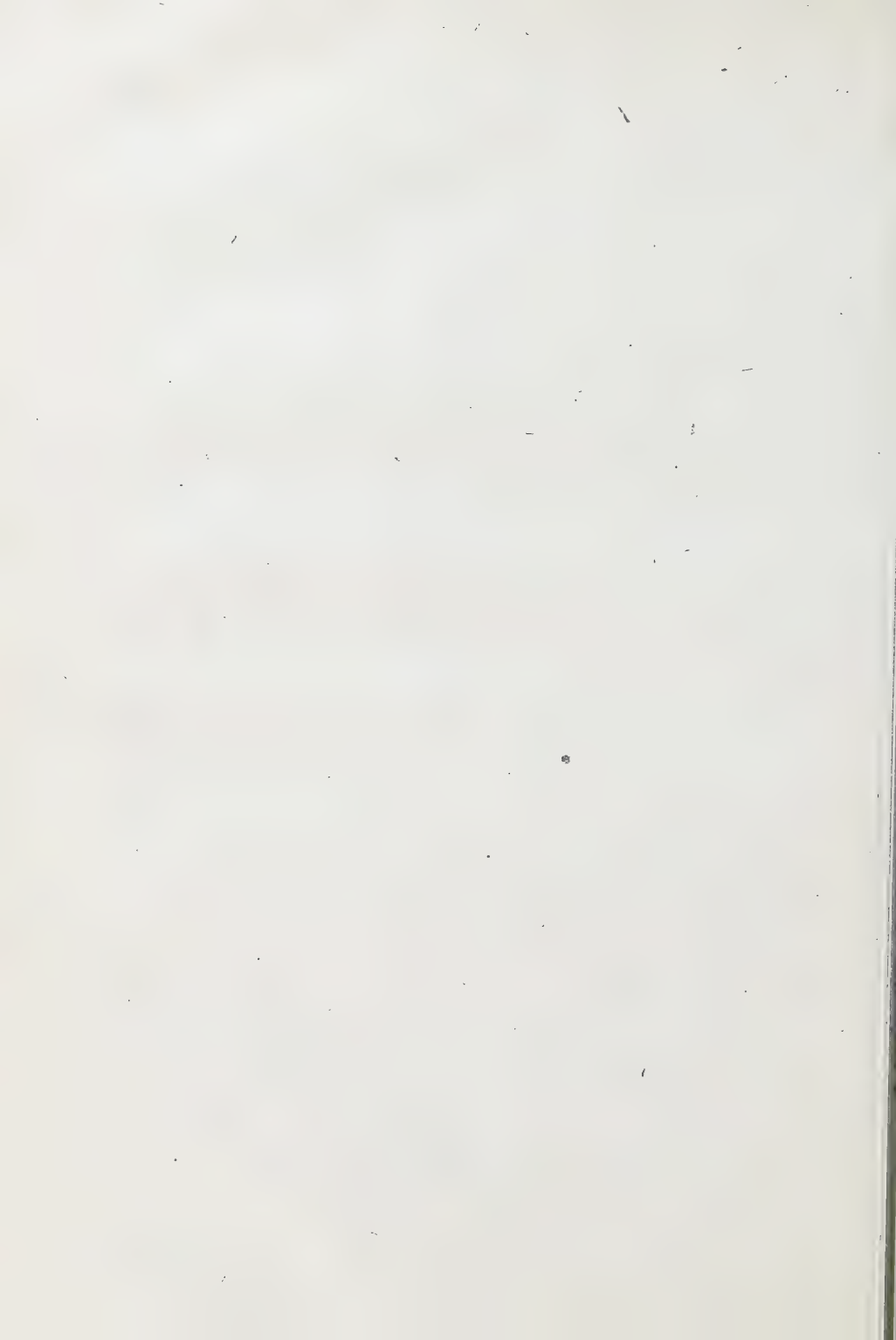
4. Setzt man der polierten Reishahrung das Cholesterin zu und verabfolgt zugleich Vitamin B₁ täglich, so zeigt sich der Cholesteringehalt in der Nebenniere höher als bei normalen Tieren; er beträgt sogar die fünffache Menge im Vergleich mit demjenigen bei B₁-Avitaminose. Auch die Menge der U.U.S. verhält sich beinahe gleich wie bei normalen Tieren, sie erreicht sogar die dreifache Menge im Vergleich mit der bei B₁-Avitaminose.

Aus der obigen Tatsache geht hervor, dass die Menge des Cholesterins und der U.U.S. in der Nebenniere fast gleichlaufend schwankt und dass Vitamin B₁ nicht allein innige Beziehung zum Cholesterinstoffwechsel, sondern auch zum Stoffwechsel der U.U.S. in der Nebenniere hat.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. Y. Sueyoshi für seine Anregung und Anleitung bei dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Beznak (1923): *Biochem. Z.*, **141**, 1.
Hotta (1924): *Z. Physiol. Chem.*, **136**, 1.
Kimizuka (1938): *J. Biochem.*, **27**, 469.
Kodama (1925): *J. Biochem.*, **5**, 185.
Kumagawa u. Suto (1908): *Biochem. Z.*, **8**, 212.
Lawaczek (1923): *Biochem. Z.*, **125**, 229.
Milbradt (1930): *Biochem. Z.*, **223**, 278.
Schmitz (1927): *Biochem. Z.*, **183**, 328.
Verzar u. Peter (1924): *Pfl. Arch.*, **208**, 659.



BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UNVERSEIFBAREN SUBSTANZEN.

VI. Mitteilung.

Über den Einfluss des Vitamin C auf den Gehalt der Gefäße an unverseifbarer Substanz.

VON

KINZO ARAI.

(Aus dem mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1940)

EINLEITUNG.

Über die Menge der unverseifbaren Substanz in den verschiedenen Geweben bei C-Avitaminose liegt die Untersuchung von Nagayama und Tagaya (1929) vor. Hiernach ist mit Ausnahme der Nebenniere in den übrigen Geweben beinahe keine Schwankung festzustellen. Es fehlen aber die Mitteilungen über die Blutgefäße. Nach der Untersuchung von Kimizuka (1938) schwankt gleichlaufend der Gehalt des Cholesterins und der unbekannten unverseifbaren Substanz (U.U.S.) in den Tiergeweben. Ich habe deshalb, um die Schwankung der Menge unverseifbarer Substanz in den Gefäßen bei C-Avitaminose, d. h. des Cholesterins und der U.U.S. zu erkennen, die im Nachstehenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODE.

Zwecks Erzeugung der C-Avitaminose wurden die Meerschweinchen mit Schermann'scher Kost gefüttert. Das Material der Blutgefäße von 5 Tieren wurde zusammen für die Analyse verwendet, weil das von einem Tier dafür nicht genügend war.

Die unverseifbare Substanz wurde mittels der Fettbestimmungsmethode nach Kumagawa-Suto (1908) gemessen, und das

darin befindliche Cholesterin mit Liebermann-Burchard'scher Methode gewogen. Die sich durch Subtraktion der Cholesterinmenge von der Menge der unverseifbaren Substanz ergebende Differenz stellt die Menge der U.U.S. dar.

Versuch I.

Zuerst wurde bei den Gefäßen der normalen Meerschweinchen die Menge der unverseifbaren Substanz gemessen, um die Resultate mit denen bei den anderen Geweben zu vergleichen. Die Ergebnisse sind aus Tabelle I zu ersehen.

TABELLE I.

Gewebe	unverseif. Subst. (%)	Cholesterin (%)	U. U. S. (%)
Gefäß	13,969	0,086	13,883
Leber	0,351	0,215	0,136
Herz	0,282	0,108	0,174
Muskel	0,134	0,055	0,079

Nach den Ergebnissen in Tabelle I enthalten die Blutgefäße die unverseifbare Substanz viel reichlicher als Leber, Herz und Muskel, was nach der Tabelle nicht auf den reichlichen Gehalt des Cholesterins in den Blutgefäßen, sondern auf den der U.U.S. zurückzuführen ist.

Um zu wissen, ob die Tatsache, dass die Blutgefäße die U.U.S. reichlich enthalten, für andere Tiere ebenfalls geltend sei oder nicht, habe ich bei verschiedenen Tierarten diese Messung angestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II gezeigt.

TABELLE II.

Tier	unverseif. Subst. (%)	Cholesterin (%)	U. U. S. (%)
Meerschw.	13,969	0,086	13,883
Kaninch.	5,682	0,058	5,624
Huhn	5,169	0,075	5,094
Pferd	1,641	0,055	1,586
Hund	0,564	0,118	0,446
Schwein	0,229	0,086	0,143
Rind	0,222	0,091	0,131

Wie die Ergebnisse in Tabelle II zeigen, ist die Menge der U.U.S. in den Blutgefäßen den Tieren nach verschieden; sie ist beim Meerschweinchen am reichlichsten, dann folgen Kaninchen und Huhn; bei Hund, Schwein und Rind ist sie unbedeutend.

Versuch II.

Sodann wurde die Messung an Meerschweinchen angestellt, bei denen durch die Fütterung mit Scherman'scher Kost Skorbut aufgetreten war. Es wurde das in Tabelle III dargestellte Ergebnis erhalten. Der Skorbut tritt etwa am 25. Tage nach Versuchsbeginn auf, wobei es zu Blutungen in Unterhautgewebe, Zahnfleisch, Gelenk, Bauchfell, Darm (besonders Dickdarm) und Uterus kommt.

TABELLE III.

Nr.	unverseif. Subst. (%)	Cholesterin (%)	U. U. S. (%)
1	2,675	0,072	2,603
2	3,803	0,072	3,731
Mittel	3,239	0,072	3,167

Wie das Ergebnis in Tabelle III zeigt, betrug bei Skorbut die unverseifbare Substanz 2.67%, welche im Vergleich mit 13.96% der normalen Tiere ausserordentlich niedrig ist. Diese Abnahme ist nicht auf die Abnahme des Cholesterins, sondern auf die der U.U.S. zurückzuführen, und zwar beträgt die Menge der U.U.S. bei normalen Tieren 13.88% und in diesem Falle nur 3.16%.

Versuch III.

Im zweiten Versuch wurde einwandfrei festgestellt, dass die Menge der unverseifbaren Substanz in den Gefäßen der Meerschweinchen, bei denen der Skorbut experimentell erzeugt worden war, erheblich abnimmt. Im nächsten Versuch wurde untersucht, wieweit die Rückkehr der abgenommenen Menge der unverseifbaren Substanz in den Gefäßen möglich ist, wenn den skorbutischen

Meerschweinchen täglich 50 mg Ascorbinsäure durch 22 Tage zugeführt wird. Dabei wurde bemerkt, dass etwa am 19. Tage nach der Ascorbinsäure-Verabfolgung die Blutung im Stuhl aufgehoben war und auch die Bewegungen der Tiere lebhaft wurden. Das Ergebnis zeigt Tabelle IV.

TABELLE IV.

Nr.	unverseif. Subst. (%)	Cholesterin (%)	U. U. S. (%)
1	7,559	0,090	7,468
2	8,380	0,102	8,277
Mittel	7,969	0,096	7,873

Nach dem Ergebnissen der Tabelle IV betrug die Menge der unverseifbaren Substanz 7.96% ; sie erreicht noch nicht 13.96% der normalen Tiere, jedoch ist sie im Vergleich mit 2.67% bei Skorbut deutlich wiederhergestellt. Dass diese Erscheinung auf die Wiederherstellung der verringerten Menge der U.U.S. zurückzuführen ist, belegen eindeutig die Daten in Tablle IV.

Versuch IV.

Der vorige Versuch bestätigte, dass Vitamin-C die abgenommene Menge an der U.U.S. in den Gefäßen der sksorbitischen Meerschweinchen wiederherzustellen vermag. Menschiek und Page (1933) führten an, dass bei Cholesterin-Darreichung an Meerschweinchen dasselbe sich in den Gefäßen abgelagert und die Cholesterin-Steatose entsteht. Kimizuka(1938) und Saito(1940) haben bewiesen, dass es bei Cholesterinzufuhr an Tiere nicht nur zur Zunahme des Cholesterins in den Geweben, sondern auch gleichlaufend zur Zunahme der U.U.S. kommt. Ich habe deshalb den Meerschweinchen zugleich mit Schermann'scher Kost das Cholesterin täglich je 0.1 g zugeführt und am 27. Tage die Gefäße für die Analyse verwendet. Die Blutung in der Bauchhöhle und den Gelenken ist hierbei gering, jedoch ist im Kot auffallende Blutung zu konstatieren. Das Ergebnis zeigt Tabelle V.

TABELLE V.

Nr.	unverseif. Subst. (%)	Cholesterin (%)	U. U. S. (%)
1	5,000	0,200	4,799
2	3,688	0,163	3,525
Mittel	4,344	0,182	4,162

Wie aus Tabelle V hervorgeht, beträgt die Menge der unverseifbaren Substanz durchschnittlich 4.34%; sie ist im Vergleich mit 2.67% bei Skorbut etwas höher, ist aber weitaus geringer im Vergleich mit 13.96% bei normalen Tieren. Die Durchschnittsmenge des Cholesterins ist 0.182%, also bedeutend höher als 0.072% bei Skorbut und etwas höher als 0.086% bei normalen Tieren. Die Durchschnittsmenge der U.U.S. ist 4.16%, also etwas höher im Vergleich mit 2.60% bei Skorbut, aber weitaus geringer als bei normalen Tieren (13.88%).

Nach den obigen Ergebnissen übersteigt die Cholesterinmenge der Gefäße den Normalwert und die Menge der U.U.S. liegt weitaus unter demselben, wenn den Tieren mit Vitamin C-Mangelernährung zugleich Cholesterin verabfolgt wird.

Versuch V.

Nachdem der Versuch gezeigt hatte, dass bei gleichzeitiger Verabfolgung von Schermann'scher Kost und Cholesterin die Cholesterinmenge der Gefäße bei Meerscheinchchen eine Zunahme, dahingegen die U.U.S. eine Abnahme erfährt, sollte der nächste Versuch feststellen, welcher Einfluss sich bemerkbar macht, wenn zusammen mit Cholesterin Vitamin-C dargereicht wird. Es wurde der gleiche Versuch wie der vierte durchgeführt, indem täglich 20 mg Ascorbinsäure injiziert und am 25. Tage danach die Gefäße zur Analyse verwendet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI wiedergegeben.

Nach den Ergebnissen in Tabelle VI beträgt die Durchschnittsmenge des Cholesterins 0.20% und stimmt mit 0.18% bei gleichzeitiger Verabfolgung von Schermann'scher Kost und Cholesterin

TABELLE VI.

Nr.	unverseif. Subst. (%)	Cholesterin (%)	U. U. S. (%)
1	12,129	0,240	11,888
2	16,778	0,173	16,605
Mittel	14,454	0,207	14,247

nahezu überein. Die Durchschnittsmenge der U.U.S. beträgt hierbei 14.24%, ist weitaus höher als 4.16% bei gleichzeitiger Darreichung von Schermann'scher Kost und Cholesterin und liegt über dem normalen Wert (13.38%). Hieraus geht hervor, dass bei gleichzeitiger Zufügung von Cholesterin und Vitamin C zur Schermann'schen Kost es nicht nur zur Zunahme des Cholesterins in den Gefäßen kommt, sondern auch die Abnahme der U.U.S. in den letzteren verhindert werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die obigen Ergebnisse führen zu folgender Schlussfolgerung.

1. Bei Meerschweinchen ist die Menge der unbekannten unverseifbaren Substanz (U.U.S.) in den Blutgefäßen reichlicher als in den anderen Geweben, auch reichlicher als bei anderen Tieren.

2. Sie zeigt bei Skorbut eine deutlich Abnahme.

3. Wird den Meerschweinchen mit experimentell erzeugtem Skorbut Ascorbinsäure zugeführt, so kommt es dadurch zur Wiederherstellung der Menge der U.U.S.

4. Wird der Schermann'schen Kost das Cholesterin zugefügt, so kommt es zur Zunahme des Cholesterins in den Gefäßen, während die U.U.S., ebenso wie bei der Fütterung mit Schermann'scher Kost ohne Cholesterinzufügung, abnimmt.

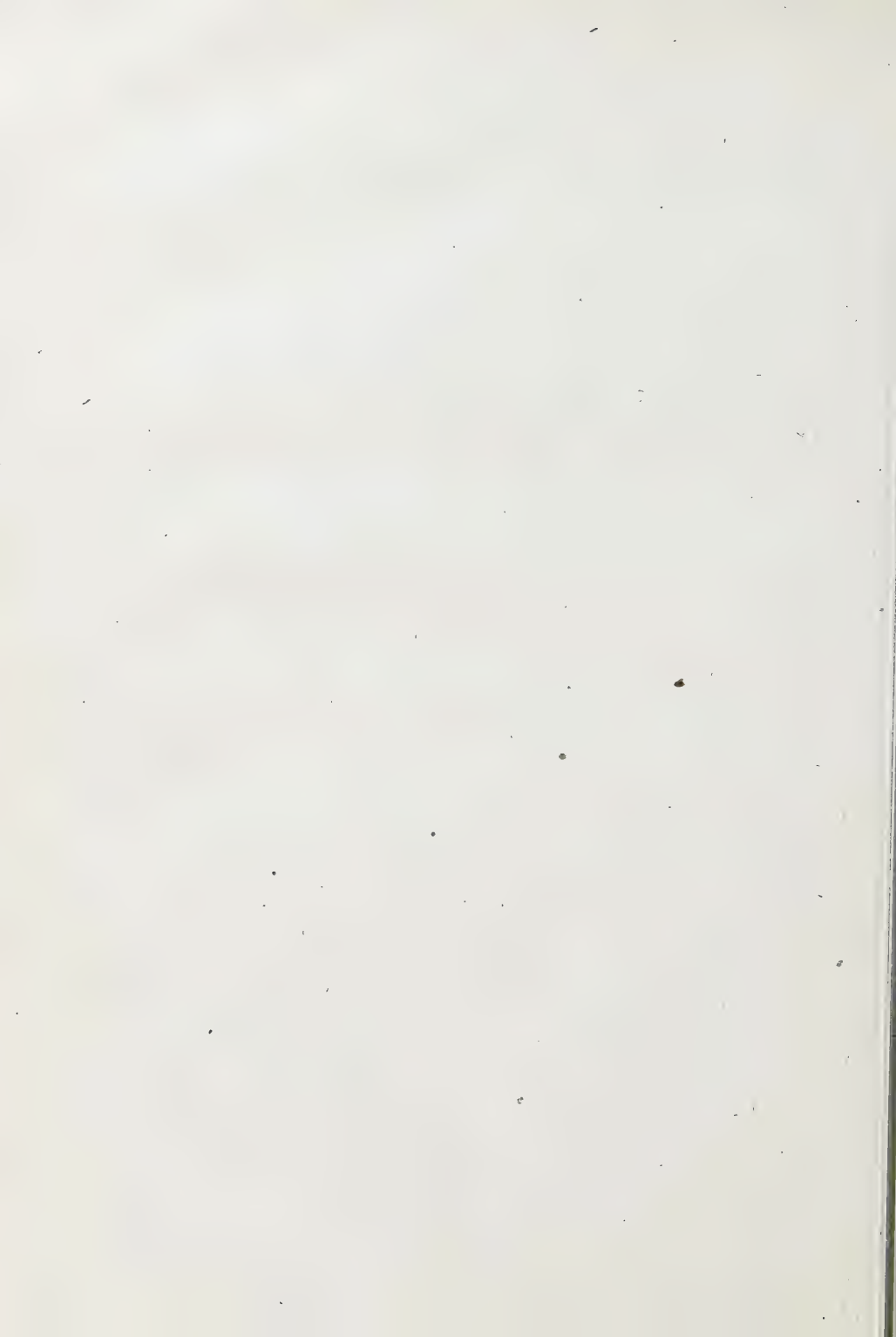
5. Werden mit der Schermann'schen Kost gleichzeitig Cholesterin und Vitamin C verabfolgt. So kommt es zur Zunahme des Cholesterins und zugleich ist die Abnahme der U.U.S. zu hemmen.

6. Nach den obigen Tatsachen hat Vitamin C zum Stoffwechsel der U.U.S. in den Gefäßen eine Beziehung.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. Y. Sueyoshi für seine Anregung und Anleitung bei dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Kimizuka (1938): J. Biochem., **27**, 469.
Kumagawa u. Suto (1908): Biochem. Z., **8**, 212.
Menschick u. Page (1933): Z. Physiol. Chem., **218**, 95.
Nagayama u. Tagaya (1929): J. Biochem., **11**, 225.
Saito (1940): J. Biochem., **31**, 143.



ÜBER DIE PROTEOLYTISCHEN ENZYME DES DARMSAFTES.

II. Mitteilung: Über die Proteinasewirkung des Darmsaftes.

VON

MASATAKA MATSUO.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität, Sendai.*

Director: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1940)

Nach der Angabe von Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser (1927) wurde, wie schon s. Z. von Cohnheim (1901) angegeben im Darmsaft des Hundes nur die Erepsinwirkung, aber weder Trypsin- noch Kinasewirkung, beobachtet, während die tryptische Wirkung in der Mazeration der Dünndarmschleimhaut von vielen Seiten bestätigt wurde. Man hegt die Vermutung, dass sie von der Pankreassaftinfiltration in der Dünndarmschleimhaut herrühren könne.

Im Gegensatz zu den Angaben der älteren Literatur über die Wirkungen des von Cohnheim entdeckten Darmerepsins, nach welchen man unter seinen spezifischen Substraten die synthetischen Peptide sowie die Peptone der peptischen und tryptischen Verdauung und ferner Protamine, Histon und auch Casein zusammenfasste, obwohl das Erepsin nicht spaltend auf andere native Eiweisskörper wirkte, haben Waldschmidt-Leitz und Harteneck (1925) die Schlussfolgerung der Spaltbarkeit von Pepton (Pepton ex albumine, Merck), Casein wie Fibrin, Gliadin, Zein und ferner auch von Clupein und Histon (Thymus) durch das von Trypsin (Gelatine-Spaltung) befreite Pankreaserepsin als unhaltbar angegeben und diese Autoren haben gefolgert, dass die angeführten Beobachtungen über ihre Hydrolyse nur auf die Verunreinigung der angewandten Enzympräparate durch Trypsin zurückzuführen sind. Darauf haben Waldschmidt-Leitz und

Schäffner (1926) diese Ergebnisse mit diesen genannten Substraten neben Eieralbumin und Ricinus-Globulin in den Versuchen mit trypsinfreiem Darmerepsin bestätigt. Trotzdem wurde die Hydrolyse von Caseino-Pepton durch Darmerepsin aber von Waldschmidt-Leitz und Simons (1926) und diejenige von Teleo-Pepton aus Fleisch durch Darmsaft von Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser (1927) festgestellt und nun bleibt die Frage betreffs der Caseinspaltung durch Darmerepsin offen, da Antonio (1923) die Spaltung von Casein und Protamin durch den Hundedarmsaft (aus einer Vella-Dünndarmfistel) beobachten konnte, aber nicht die von anderen Eiweisskörpern wie Ochsenalbumin, Zein, Gliadin und Fibrin (gekochtes), nachdem O. Cohnheim (1902) zur Erweiterung der Kenntnisse über das Erepsin die Hydrolyse von Albumosen, Pepton, Clupein, Histon und auch von Casein durch eine trypsinfreie Erepsinlösung aus Hundedarm berichtet hatte, der gegenüber andere Eiweisskörper sehr stark widerstanden.

In der vorigen Abhandlung (1941) hat Verf. über das Verhalten der Peptonase, Dipeptidase und Halogenacylase des Darmsaftes berichtet und besonders darauf aufmerksam gemacht, dass eine ziemlich starke, für Chloracetylleucin eingestellte Halogenacylase im Darmsaft sich befindet, in dem Acylase (Histozym u. Dipeptidacylase) und Carboxypolypeptidase (Acyldipeptidase) im engeren Sinne vermisst wurden. Im fortgesetzten Studium der Darmsaftproteasen hat Verf. hier weiter unter Leitung von Prof. Utzino die Proteinase-Wirkung des Darmsaftes hin geprüft, der aus der Thiry-Vellaschen Darmschlinge des Hundes gesammelt wurde, wobei man auch das Verhalten der Mazeration dieser ausgeschalteten Schlingenschleimhaut zu Vergleichszwecken untersucht. Es hat sich dabei ergeben, dass Eiweisskörper wie Albumine, Fibrin und Edestin der Darmsaftwirkung stark widerstanden, während im Casein- und Gelatinedigestat erst nach längerer Digestion wie 72 Stunden eine nicht zu unterschätzende Zunahme der Acidität (nach Sörensen) und des Aminostickstoffs (nach Van Slyke) festgestellt wurde, die aber in 24 stündiger Digestion kaum mit Sicherheit beurteilt werden konnte (Tabelle I).

Um die Frage, ob diese verzögerte Spaltung dieser beiden Eiweisskörper auf die eigentliche Darmsftwirkung zurückzuführen ist, zu beantworten, wurden einige weitere Versuche unternommen. Hier sei auch hervorgehoben, dass die Caseinspaltung durch Darmsaft auch durch Zunahme des Reststickstoffs wie des Aminostickstoffs im Filtrat des mit Trichloressigsäure enteweissten Digestats sich erwies und sie immer weiter mit der verlängerten Digestionszeit fortschreiten kann (Tabelle II a u. II b). Diese nur in späterer Zeit der Digestion (nach 72 Stunden) auftretende Caseinhydrolyse (wie Gelatine) lässt den Verdacht aufkommen, ob nicht nach Aufbewahrung bei pH 7,8 die Caseinlösung eine teilweise Veränderung also vielleicht eine schwache Hydrolyse durch diese Pufferwirkung erfuhr, die eben die Einwirkung des Darmerepsins (Peptonase) auf dieses veränderte Caseinmolekül zugänglich machen kann. Um diese Vorwirkung durch Pufferlösung auszuschliessen, wurde Caseinlösung mit Puffer (pH 7,8) allein oder mit Puffer-(pH 7,8) und erhitztem Saft bei 37°C 72 Stunden lang aufbewahrt und dann der Darmsaftwirkung unterworfen (Tabelle III u. IV).

Wie die Ergebnisse zeigen, trat die Aciditätszunahme auch erst nach 72 Stunden auf und kein besonderer Einfluss der Vorbehandlung wurde festgestellt. Um auf die Frage, ob diese schwache Casein- oder Gelatinehydrolyse durch die lang dauernde Darmsaftwirkung vom Pankreassaft herrührt, der durch irgendeine akzessorische der Beobachtung entgehende Kommunikation in die isolierte Schlinge sezerniert werden mag, eine Antwort geben zu können, hat man hier den Kinaseeinfluss auf den Darmsaft hin geprüft, da die schwache tryptische Wirkung, die nur nach einer längeren Digestion auftrat, wie eine nicht aktivierte Trypsinwirkung zu sein schien. Die Darmkinase blieb aber ohne Einfluss auf die Caseinhydrolyse durch den Darmsaft (Tabelle V).

Wie schon bekannt ist, hat man eine starke Eiweisshydrolyse durch die Mazeration der Dünndarmschleimhaut des Hundes bestätigt, die in der Hauptsache bei schwach alkalischer Reaktion und zwar am günstigsten bei pH 7,5 auftrat. In der Mazeration der Schleimhaut der isolierten Thiry-Vellaschen Schlinge hat man aber kaum eine allgemeine tryptische Hydrolyse der Eiweisskörper

(Albumine und Edestin) bestätigt, während nur Casein und Gelatine deutlich durch die Mazeration angegriffen werden konnten, wie Pepton-Witte (Tabelle VI u. VII).

Auf Grund dieser Beobachtung, die gut mit dem Versuche mit Darmsaft übereinstimmt, möchte man wohl im Darmsaft bzw. in der Schleimhautmazeration der ausgeschalteten Darmschlinge des Hundes, in der die Wirkung des Pankeastrypsins ausgeschlossen ist, eine besondere eigentümliche tryptische Proteinasewirkung (Enterotryptase) annehmen, die besonders für die Casein- und Gelatinehydrolyse eingestellt ist. Hier sei auch hervorgehoben, dass die Mazeration nicht Benzoyldiglycin wohl aber Chloracetyl-L-Phenylalanin angreifen konnte, das jedoch dem Darmsaft widerstand (Tabelle VII). Im Proteindigestat durch Pankreassaft hat man eine verstärkte Aciditätszunahme festgestellt, die durch Zusatz von Darmsaft zur Beobachtung kam (Tabelle VIII).

Da der Pankreassaft schon spontan aktiviert wurde, mag die vermehrte Aciditätszunahme durch Zusatz vom Darmsaft wohl durch sekundäre Spaltung des Trypsindigestats durch Darmsafterepsin verursacht werden. Die Beobachtung, dass der Darmsaft, der 5 Tage lang im Eisschrank oder 3 Tage lang im Brutschrank aufbewahrt wurde, auch noch eine Förderung der Digestion mit Pankreassaft erzielen konnte, der ebenso wie Darmsaft aufbewahrt wurde, lässt an die Resistenz der Darmsaftwirkung denken (Tabelle IX) und die Versuche mit erhitztem Darmsaft, der kaum mehr Erepsinwirkung zeigen konnte, erfolgten im gleichen Sinne wie diejenigen mit frischem Darmsaft, indem die Caseinhydrolyse durch Pankreassaft durch Zusatz von erhitztem Darmsaft verstärkt wurde, der nicht mehr Pepton-Witte angreifen konnte (Tabelle X). Diese Ergebnisse haben wohl zu der Vermutung geführt, dass man unter dieser fördernden Wirkung des Darmsaftes auf Pankreassaft, der teilweise spontan aktiviert wurde, eine Kinasewirkung des Darmsaftes verstehen dürfte, obwohl Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser(1927) keine Kinasewirkung im Darmsaft feststellen konnten. Die Untersuchung wird im hiesigen Institut weiter fortgesetzt.

Experimenteller Teil.

Eiweiss-Spaltung durch den Darmsaft des Hundes.

Versuchsansatz: 20 ccm 2%iger Substratpufferlösung + 1 ccm Darmsaft mit 1 ccm Wasser + Toluol; digeriert bei PH 7,8 und 37°C. Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat wurde nach Sørensen und $\text{NH}_2\text{-N}$ Zunahme in 1 ccm derselben nach Van Slyke bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Darmsaft-Pufferlösung ohne Substrat geprüft.

TABELLE I.

Eiweiss-Spaltung durch den Darmsaft des Hundes.

Aciditätszunahme in 5 ccm und $\text{NH}_2\text{-N}$ Zunahme in 1 ccm Digestat			
Substrate	Zeit (Std.)	ccm 0,1 n-NaOH	mg $\text{NH}_2\text{-N}$
Casein (Hammarsten)	24	0,05	0,023
	48	0,15	—
	72	0,45	0,205
Gelatine (Kokko C)	24	0,10	0,020
	48	0,15	—
	72	0,25	0,143
Fibrin	24	0	0,013
	48	—	—
	72	0,05	0,034
Eieralbumin (E. Merck)	24	—0,05	—0,032
	48	—	—
	72	—0,10	—0,029
Serumalbumin (E. Merck)	24	—0,05	—
	48	—	—
	72	—0,10	—
Edestin	24	0,05	0,016
	48	—	—
	72	0,05	0,021

Eiweiss-Spaltung durch den Darmsaft des Hundes.

20 ccm 2% Substrat-Phosphatpufferlösung (PH 7,8) mit 2 ccm frischem Darmsaft unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert. Nach 24 oder 72 Std. pipettierte man 5 ccm Digestatlösung ab, die mit 5 ccm 10%iger Trichloressigsäure versetzt und von der Fällung abfiltriert wurde. Dann hat man $\text{NH}_2\text{-N}$ Zunahme (nach Van Slyke) in 2 ccm und Gesamt-N in 4 ccm (nach Kjeldahl) dieses enteiweissten Filtrates vor und nach der Digestion bestimmt.

Kontrastierender Versuch: 20 ccm 2% Substrat-Phosphatpufferlösung (PH 7,8) + 1 ccm spontan aktiviertes Pankreassaftes des Hundes mit 1 ccm Wasser + Toluol; digeriert bei 37°C. Hier wurde die Reststickstoffmenge in 4 ccm enteiweisstem Filtrat ermittelt. In den Tabellen sind die korrigierten Zunahme-Werte angegeben.

TABELLE II-a.

Eiweiss-Spaltung durch den Darmsaft des Hundes.

Zunahme von $\text{NH}_2\text{-N}$ (mg) in 2 ccm oder Gesamt-N (mg) in 4 ccm Filtrat									
	Zeit (Std.)	Casein (Hammarsten)		Ovalbumin (Merck)		Serumalbumin (Merck)		Edestin	
		$\text{NH}_2\text{-N}$	Gesamt-N	$\text{NH}_2\text{-N}$	Gesamt-N	$\text{NH}_2\text{-N}$	Gesamt-N	$\text{NH}_2\text{-N}$	Gesamt-N
Hauptversuch mit Darmsaft	24	0,04	0,05	-0,01	0	0	-0,01	0	0,04
		0,08	0,25	0,01	-0,08	—	0	0,03	0
	72	0,21	1,03	-0,01	0,02	0	0,06	0	0,05
		0,30	1,39	0,03	-0,01	—	0,04	0,03	0,01
Kontrolle mit Pankreassaft (aktiv.)	24	—	3,00	—	0,06	—	0,15	—	0,60
	72	—	5,95	—	0,34	—	0,27	—	0,87

Caseinspaltung durch langdauernde Darmsaftwirkung.

50 ccm 1% Casein (Hammarsten)-Phosphatpufferlösung (PH

7,8) + 3 ccm frischen Darmsaftes mit 3 ccm Wasser + Toluol; digeriert bei 37°C.

TABELLE II-b.

Caseinspaltung durch langdauernde Darmauftwirkung.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)							
Zeit (Tage)	1	2	3	6	8	10	11
ccm 0,1 n-NaOH	0,05	0,20	0,40	0,90	1,20	1,30	1,35

Darmauftwirkung auf die mit Phosphat-Puffer (pH 7,8) bei 37°C 72 Std. aufbewahrte Caseinlösung.

60 ccm 1% Casein (Hammarsten)-Phosphatpufferlösung (pH 7,8) + 6 ccm Wasser (ohne Enzym) + Toluol; aufbewahrt bei 37°C während 72 Stunden. Aciditätszunahme in 4 ccm; 0,03 ccm 0,1 n-NaOH nach 72 Std. 20 ccm dieses Digestats + 1 ccm frischen Darmsaftes mit 1 ccm Wasser (a), oder + 2 ccm Wasser (ohne Enzymzusatz) (b) + Toluol; digeriert bei pH 7,8 und 37°C.

TABELLE III.

• Darmauftwirkung auf die mit Phosphat-Puffer (pH 7,8) bei 37°C 72 Std. aufbewahrte Caseinlösung.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestion (ccm 0,1 n-NaOH)						
Substrat	a) mit frischem Saft			b) mit Wasser		
	5 Std.	24 Std.	72 Std.	5 Std.	24 Std.	72 Std.
Casein	0,02	0,16	0,58	0,01	0,05	0,07

Darmauftwirkung auf die mit Phosphatpuffer-Darmsaft(erhitzt) bei 37° während 72 Stunden aufbewahrte Caseinlösung.

60 ccm 1% Casein (Hammarsten)-Phosphatpufferlösung (pH 7,8) + 3 ccm 30 Min. lang im siedenden Wasser erhitztes Darmsaftes mit 3 ccm Wasser + Toluol; bei 37°C 72 Stunden lang aufbewahrt. Aciditätszunahme in 4 ccm; 0,02 ccm 0,1 n-NaOH nach 72 Stunden.

20 ccm dieses Digestats + 1 ccm frisches Darmsaftes mit 1 ccm Wasser (a), oder + 1 ccm des oben angegebenen, erhitzten unter Toluolzatz im Brutschranke aufbewahrten Darmsaftes mit 1 ccm Wasser (b) + Toluol: digeriert bei P_H 7,8 und $37^\circ C$.

TABELLE IV.

Darmsaftwirkung auf die mit Phosphatpuffer-Darmsaft (erhitzt) bei 37° während 72 Stunden aufbewahrte Caseinlösung.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestion (ccm 0,1 n-NaOH)					
a) mit frischem Saft			b) mit erhitztem Saft		
5 Std.	24 Std.	72 Std.	5 Std.	24 Std.	72 Std.
0,02	0,15	0,54	0	0,02	0,03

Wirkung des mit Enterokinase behandelten Darmsaftes auf Casein (Hammarsten) und Gelatine.

1 ccm Darmsaft wurde mit 0,05 g der aus Schleimhaut des Schweindünndarms bereiteten Enterokinasepulver im Brutschranke 30 Minuten lang aufbewahrt und dann ihre Aktivität geprüft.

Versuchsansatz: 20 ccm 2% Substrat-Phosphatpufferlösung (P_H 7,8) + 1 ccm nicht behandelten oder behandelten Darmsaftes, mit 1 ccm Wasser + Toluol; digeriert bei $37^\circ C$.

TABELLE V.

Wirkung des mit Enterokinase behandelten Darmsaftes auf Casein (Hammarsten) und Gelatine.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)				
Zeit (Std.)	Casein		Gelatine	
	ohne Kinase	mit Kinase	ohne Kinase	mit Kinase
5	0,05	0	0,02	0
24	0,05	0,10	0,05	0
72	0,38	0,45	0,13	0,15

Proteolytische Wirkungen der Dünndarmschleimhautmazeration (Hund).

Versuchsansatz: 20 cem 2%iger Substrat-Phosphatpufferlösung + 2 cem Dünndarmschleimhautmazeration des Hundes (1 Teil Schleimhautbrei + 3 Volumteile Glycerinwasser). Beim Versuch b) wurde die Schleimhaut des Duodenalteils und bei c) die des Ileumteils zur Mazeration gebraucht.

TABELLE VI.

Proteolytische Wirkungen der Dünndarmschleimhautmazeration (Hund).

Aciditätszunahme in 5 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)								
Substrate	Zeit (Std.)	pH						
		4,0	5,0	6,0	7,0	7,5	8,5	9,5
a) Gelatine	24	0,60	1,05	1,70	3,25	4,75	3,55	3,55
	72	0,80	2,15	3,20	4,25	5,80	4,40	4,60
b) "	24	—	—	—	—	3,80	—	—
	72	—	—	—	—	6,10	—	—
c) "	24	—	—	—	—	4,15	—	—
	72	—	—	—	—	6,15	—	—
b) Casein (Hammarsten)	24	—	—	—	—	1,45	—	—
	72	—	—	—	—	4,45	—	—
c) "	24	—	—	—	—	1,30	—	—
	72	—	—	—	—	4,30	—	—
a) Pepton (Witte)	24	0,30	2,35	2,35	3,40	3,50	2,70	3,00
	72	1,15	3,45	4,60	5,15	5,60	3,25	3,35
b) "	24	—	—	—	—	2,85	—	—
	72	—	—	—	—	5,85	—	—
c) "	24	—	—	—	—	2,50	—	—
	72	—	—	—	—	5,90	—	—

Proteolytische Wirkung der Dünndarmschleimhautmazeration der isolierten Thiry-Vellaschen Dünndarmschlinge des Hundes.

Die Dünndarmschleimhautmazeration, die mit ausgekratztem

Schleimhautbrei der ausgeschalteten Darmschlinge bereitet wurde, enthält 1 Teil Schleimhautbrei in 3 Volumteilen Glycerinwasser (1:1).

Versuchsansatz: 20 ccm 2%- oder 1/20 Mol-Substrat-Phosphatpufferlösung (P_H 7,8) + 1 ccm Dünndarmschleimhautmazeration mit 1 ccm Wasser; digeriert bei 37°C unter Toluolzusatz.

Kontrollversuch: 20 ccm 1/20 Mol-Substrat-Phosphatpufferlösung - dem frisches Darmsaftes mit 1 ccm Wasser + Toluol; digeriert bei 37°C.

TABELLE VII.

Proteolytische Wirkung der Dünndarmschleimhautmazeration der isolierten Thiry-Vellaschen Dünndarmschlinge des Hundes.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)			
Enzym	Substrate	24 Std.	72 Std.
Darmschleimhaut- Mazeration	Casein (2%) (Hammarsten)	0,40	0,60
	Gelatine (2%)	0,40	0,75
	Ovalbumin (2%) (Merck)	0	0
	Serumalbumin (2%) (Merck)	0,10	-0,15
	Edestin (2%)	0	0,05
	Pepton (2%) (Witte)	2,45	3,15
	Benzoyldiglycin (M/20)	0	0
Darmsaft	Chloracetyl-L-Phenylalanin (M/20)	0,30	0,40
	Chloracetyl-L-Phenylalanin (M/20)	0,10	0,10
	Chloracetyl-L-Leucin (M/20)	0,15	0,45

Einfluss der teilweise aktivierten Pankreassaft des Hundes.

Versuchsansatz: 20 ccm 2% Casein (Hammarsten)-, Gelatine-phosphatpufferlösung oder M/20 Diglycin-phosphatpufferlösung wurden mit 1 ccm spontan aktiviertem Pankreassaft und 1 ccm Darmsaft (I) oder mit 2 ccm Pankreassaft ohne Darmsaft (II) oder mit 1 ccm Darmsaft und 1 ccm H₂O ohne Pankreassaft (III) bei P_H 7,8 und 37°C unter Toluolzusatz digeriert.

TABELLE VIII.

Einfluss des Darmsaftes auf den spontan teilweise aktivierten
Pankreassaft des Hundes.

Aciditätszunahme in 5 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)				
	Substrate Zeit	Casein	Gelatine	Diglycin
(I) 1 cem Pankreassaft + 1 cem Darmsaft	24 Std. 72 Std.	2,50 2,90	1,85 2,65	—
(II) 2 cem Pankreas- saft	24 Std. 72 Std.	1,40 1,60	1,05 1,10	0,05 0,15
(III) 1 cem Darmsaft + 1 cem H ₂ O	24 Std. 72 Std.	0,05 0,45	0,15 0,25	1,30 1,85

*Einfluss des während bestimmter Tage aufbewahrten Darmsaftes
auf den gleich behandelten spontan aktivierten
Pankreassaft des Hundes.*

Der Darm- und Pankreassaft wurden während einiger Tage im Eis- oder Brutschrank aufbewahrt und dann ihre Aktivität geprüft.

Versuchsansatz: 20 cem 2% Substrat-phosphatpufferlösung mit 1 cem Darmsaft + 1 cem Pankreassaft oder mit nur 1 cem Pankreassaft + 1 cem Wasser; digeriert bei PH 7,8 und 37°C unter Toluolzusatz.

TABELLE IX.

Einfluss des während bestimmter Tage aufbewahrten Darmsaftes auf den
gleich behandelten spontan aktivierten Pankreassaft des Hundes.

	Aufbewahrt (Tage)	1 Tag				3 Tage		5 Tage	
		Eisschrank		Brutschrank		Brutschrank		Eisschrank	
		Casein	Gelatine	Casein	Gelatine	Casein	Gelatine	Casein	Gelatine
Pankreassaft mit Darmsaft	24 Std.	2,65	2,10	2,10	1,30	1,50	0,95	2,00	1,55
	72 Std.	3,05	2,95	3,00	2,55	1,80	1,40	2,30	2,40
Pankreassaft ohne Darmsaft	24 Std.	1,85	1,00	1,65	0,80	0,40	0,40	1,25	—
	72 Std.	1,90	1,20	2,05	1,10	0,85	—	1,75	0,90

*Einfluss des mit Wasser verdünnten oder erhitzten Darmsaftes
auf den spontan aktivierten Pankreassaft des Hundes.*

Versuchsansatz: 20 ccm 2% Substrat-phosphatpufferlösung wurden mit 2 ccm der mit Wasser fünfmal verdünnten Beimischung, die 1 Volumteil Darmsaft und 1 Volumteil Pankreassaft enthielt (I), mit 2 ccm des ebenso fünfmal verdünnten Pankreassaftes ohne Darmsaft (II), mit 2 ccm des ebenso fünfmal verdünnten Darmsaftes ohne Pankreassaft (III), mit 2 ccm der ebenso wie I fünfmal verdünnten Beimischung, die aber 1 Volumteil eines während 30 Minuten bei 70°C erhitzten Darmsaftes und 1 Volumteil eines nicht erhitzten Pankreassaftes enthielt (IV), oder mit 1 ccm des während 30 Min. bei 70°C wie IV erhitzten Darmsaftes + 1 ccm Wasser (V) digeriert bei PH 7,8 und 37°C unter Toluolzusatz. Hier wurde der teilweise selbst aktivierte Pankreassaft verwendet, da der ganz frische Saft nicht zur Hand war.

TABELLE X.

Einfluss des mit Wasser verdünnten oder erhitzten Darmsaftes auf den
spontan aktivierten Pankreassaft des Hundes.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)			
	Substrate	Casein (Hammarsten)	Pepton (Witte)
(I) Pankreassaft + Darmsaft	24 Std.	1,35	—
	72 Std.	1,85	
(II) Pankreassaft ohne Darmsaft	24 Std.	1,15	1,35
	72 Std.	1,45	1,85
(III) Darmsaft ohne Pankreassaft	24 Std.	0,02	0,70
	72 Std.	0,17	1,15
(IV) Pankreassaft mit erhitztem Darmsaft	24 Std.	1,45	1,25
	72 Std.	1,75	1,60
(V) Darmsaft (erhitzt)	24 Std.	—	0,05
	72 Std.		0,05

ZUSAMMENFASSUNG.

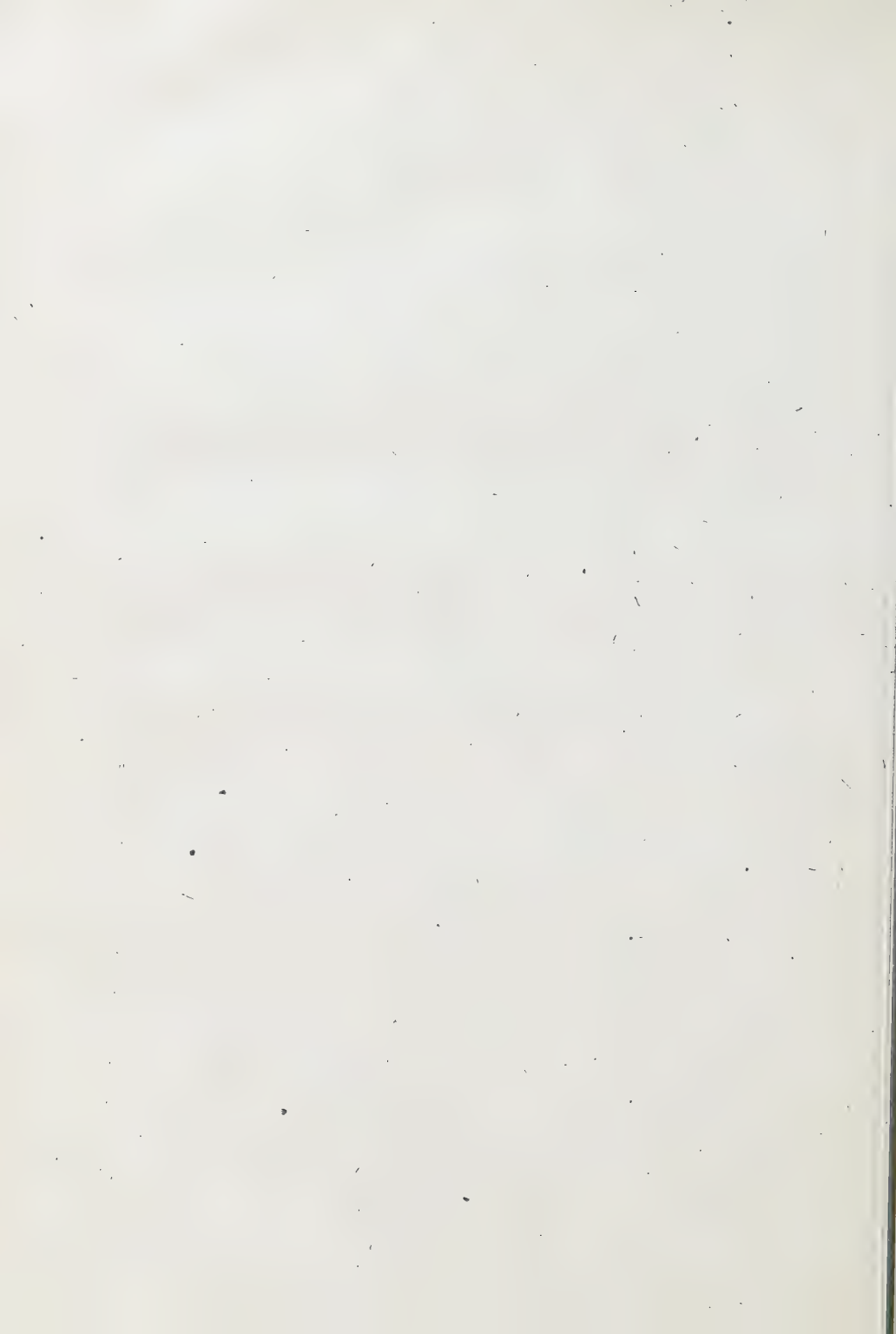
1) Der Darmsaftwirkung widerstanden Eiweisskörper (Albumine, Fibrin, Edestin), während Casein und Gelatine durch lang dauernde Wirkung (72 Std.) des Saftes angegriffen werden konnten. Man möchte mithin eine besondere Proteinasewirkung (Enterotryptase) des Darmsaftes auf Casein oder Gelatine annehmen.

2) Diese Wirkung wurde auch in der Schleimhaut-Mazeration der isolierten Thiry-Vellaschen Schlinge, in der die Wirkung des Pankreastrypsins ausgeschlossen ist, festgestellt. Diese Mazeration war imstande, auch Chloracetyl-L-Phenylalanin anzugreifen, das dem Darmsaft widerstand. Andere Eiweisskörper ausser Casein oder Gelatine widerstanden der Mazerationswirkung, während der Mazerationssaft der normalen Dünndarmschleimhaut des Hundes eine starke Trypsinwirkung aufwies, die vielleicht von dem sezernierten Pankreassaft herrühren kann.

3) Hier sei auch erwähnt, dass der Darmsaft einen verstärkenden Einfluss auf die Pankreassaftwirkung bei der Eiweisshydrolyse ausüben kann und diese Beobachtung führt zu der Vermutung, dass man wohl unter dieser ziemlich stabilern Einwirkung des Darmsaftes eine Kinasewirkung verstehen kann, obwohl Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser keine Kinasewirkung im Hundedarmsaft feststellen konnten.

LITERATUR.

- Antonio, C. (1923): Biochem. Zeits., **136**, 71.
Cohnheim, O. (1901): Zeits. f. physiol. Chem., **33**, 451.
" (1902): *ibid.*, **35**, 134.
Matsuo, M. (1941): Dieses Journ., **33**, 59.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Harteneck, A. (1925): Zeits. f. physiol. Chem., **149**, 203.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Schöffner, A. (1926): Zeits. f. physiol. Chem., **151**, 31.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Simons, E. (1926): *ibid.*, **156**, 99.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Waldschmidt-Graser, J. (1927): *ibid.*, **166**, 241.



CONTRIBUTION TO THE STUDY OF PEPTONE BLOOD.

By

TOSHIO TOMOI.

(From the Laboratory of Biological Chemistry of the
Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo.

Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, December 20, 1940)

INTRODUCTION.

Even since Schmidt-Mühlheim, Underhill and Hendrix reported that the blood of dogs injected with albumose and peptone became incoagulable for a little while, such blood has been called "peptone blood", and has hence been the subject of extensive study. Yokota suggested that the incoagulability of peptone blood is due rather to an albumose than to a peptone itself, and later verified that both the primary and secondary albumoses possessed the same action upon the blood coagulation.

I have here undertaken this experiment to find out the relative activities of the primary albumose (protalbumose) and heteroalbumose.

EXPERIMENTS.

I. The separation of proto- and heteroalbumose.

A pure primary albumose was repeatedly prepared from Witte's peptone by half saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. To remove $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the primary albumose was dissolved in a small amount of distilled water, and to this solution BaCO_3 was added and gently heated. When NH_3 was all given off, it was filtrated. To the filtrate, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ was added and boiled, and again filtered. After decomposing $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in the filtrate by heating it in a water bath, it was diluted with water.

For the isolation of two fractions, proto- and hetero-albumose, from a salt-free primary albumose just prepared by the method

mentioned above, Pick's process was employed; To the primary albumose solution twice as large an amount of 95% alcohol was added. The precipitate thus formed was dissolved with water, and was reprecipitated with half a volume of 95% alcohol. It was then washed with alcohol and ether, and dried. Pure hetero-albumose obtained in this way is a colorless powder.

The filtrate obtained in a first precipitation of primary albumose by alcohol was evaporated in a water bath, and the residue was dissolved with water to a syrupy consistency. Prot-albumose was precipitated by adding a large amount of 95% alcohol to the syrupy solution.

II. Animal experiment.

Dogs weighing about five kilo were used for the experiment. The animals were starved for 12 hours, and then injected with 1 cc. of 1% morphin hydrochloride per kilo of body weight subcutaneously prior to the experiment. The blood for the determination was drawn from a carotid artery, and the albumose solution was injected into the jugular vein. 0.3 g of the albumose to be tested per kilo of body weight was intravenously injected taking 2 minutes for the injecting. Hetero-albumose was injected in a saline solution. The clotting time of the blood was measured after a definite lapse of time after the albumose injection, i.e., at $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, and 3 hours. No shock symptom was observed after the injection of the albumose, but in a few cases abdominal grumbling was recognized.

Schultz's method was applied for determination of the clotting time of blood.

III. Results.

The results are shown in Table I.

As seen in Table I, the blood clotting time of normal dogs was 6'~16', while that of albumose injected dogs was delayed; it took 3~7 hours in the case of protalbumose (except in one case), and about 1 hour in heteroalbumose case. The clotting time was

TABLE I.

		Heteroalbumose					Protalbumose					Secondary albumose		Protalbumose + Heteroalbumose	
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	A	B
Body weight kg Sex Room temperature	Normal	5.3 ♀ 24°	5.5 ♀ 24°	4.8 ♀ 18°	5.3 ♀ 18°	7.5 ♂ 18°	4.7 ♀ 24°	5.5 ♂ 20°	7.2 ♂ 18°	6.9 ♂ 20°	6.1 ♂ 18°	5.3 ♀ 18°	4.3 ♂ 18°	6.1 ♂ 20°	7.6 ♀ 20°
		13'	12'	14'	15'	16'	9'	11'	15'	15'	16'	14'	16'	6'	7'
		15' 30'	1 ^h 40'	35'	1 ^h 25'	50'	2 ^h 45'	3 ^h 40'	40'	7 ^h 40'	5 ^h 20'	55 ^h	26 ^h	9 ^h	7 ^h
Duration between blood drawing and albumose injection	Normal	1 ^h 40'	1 ^h	17'	25'	30'	2 ^h	2 ^h 50'	25'	1 ^h 55'	1 ^h 15'	—	23 ^h	1 ^h 15'	3 ^h
		40'	20'	15'	13'	17'	40'	18'	13'	40'	21'	died	22 ^h	10'	1 ^h 50'
		14'	11'	15'	14'	16'	13'	11'	13'	15'	17'		19 ^h	7'	25'
Blood clotting time	Normal	14'	11'	15'	—	—	10'	12'	—	13'	17'		1 ^h 10'	7'	8'

gradually shortened after a certain lapse of time after the injection, returning to normal after 2~3 hours.

DISCUSSION.

From these experiments, it can be seen that both proto- and heteroalbumose retard the blood clotting time. It must be noticed, however, that the time of the blood clotting by proto- and heteroalbumose is shorter in duration than that produced by the primary and secondary albumose. Table II (after Yokota) shows a comparison of the retardation activity of the Witte's peptone, primary albumose, and secondary albumose.

TABLE II.

			Witte peptone		Primary albumose		Secondary albumose	
			A	B	A	B	A	B
Body weight kg			4,4	4,05	3,4	8,4	5,4	2,92
Sex			♀	♂	♂	♂	♂	♀
Room temperature			19°	20°	17°	28°	29°	13°
Blood clotting time	Normal		19'	17'	14'	15'	13'	18'
	Duration between blood drawing and albumose injection	10'	37 ^h	30 ^h	80 ^h	74 ^h	40 ^h	50 ^h
		30'	37 ^h	27 ^h	53 ^h	48 ^h	24 ^h	48 ^h
		1 ^h	4 ^h	22 ^h	24 ^h	27 ^h	38'	24 ^h
		2 ^h	—	2 ^h 10'	—	—	—	18 ^h
		3 ^h	50'	1 ^h 10'	—	2 ^h 30'	11'	55'

(After Yokota)

As seen in Table II, it can hardly be said that the primary and secondary albumoses show a stronger action as compared with Witte's peptone even in equal doses to retard the clotting of blood, because Witte's peptone consists of about 63% albumose and about 37% peptone:—the latter is inactive against the retardation of blood clotting. My experimental results from the dogs injected with the primary as well as secondary albumoses showed similar

results as those of Yokota. (The results will be omitted here). Moreover, it is clear that both proto- and heteroalbumose possess a weaker action than the mother substance, the primary albumose, in retarding the blood clotting. The following three reasons can be considered for the explanation of the foregoing phenomenon:—

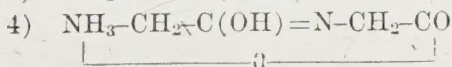
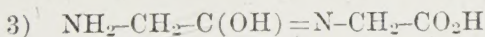
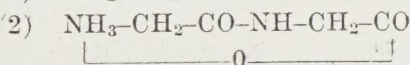
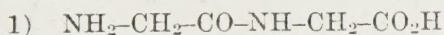
(1) Due to the fact that some principles which retard the blood clotting in primary albumose have to be removed by alcohol.

(2) Due to a synergism of proto- and heteroalbumose.

(3) Due to some configurative transformation of the polypeptide (albumose) by treating with salts and alcohol. Of these considerations, (1) and (2) can not be accepted because, according to Yokota, the alcohol extract of Witte peptone does not exert any influence upon the blood clotting, and a mixture of the proto- and heteroalbumose also does not augment the retardation activity of each albumose. The last reason (3) is, therefore, a most probable explanation. Robertson has demonstrated that a polypeptide in the solution exists in two different forms—keto and enol, in a definite equilibrium. Moreover, as each of them is able to take two forms—chain and cyclic—in the solution, there are four different forms of a polypeptide.

For instance, the forms of glycyl-glycine may be pictured as follows:

Glycyl-glycine:



It is a well known fact that the different physiological actions are brought about by keto and enol forms of a compound. It may be advisable to consider that the difference between the retardation activity of treated and untreated albumose upon the blood clotting is due to the configurative transformation of albumose.

We can not, however clearly state, which form of the polypeptide is most active. This problem is still unsolved as yet, and is open for future investigation.

CONCLUSIONS.

1. There is an individual variation in the retardation activity of albumose upon the blood clotting.
2. Proto- and heteroalbumoses retard the blood clotting in dogs, and the former is somewhat more active than the latter.
3. The activity of protalbumose is less than that of the mother substance, the primary albumose.

REFERENCES.

- Pick, E. P. (1899): *Z. f. Physiol. Chem.*, **28**, 217.
Robertson, T. B. (1918): *The Physical Chemistry of the Proteins*.
Schmidt-Mühlheim (1880): *Archiv f. Physiol. von Dubois-Reymond*, 33.
Schultz, W. (1921): *Methodik d. Blutuntersuchung von A. v. Domarus*, 158.
Underhill and Hendrix (1915): *J. Biol. Chem.*, **22**, 443-446.
Yokota, T. (1929): *Seiikwai Med. J.*, **48**, 39.

ANNOTATIONES
ZOOLOGICAE JAPONENSES

PUBLISHED BY

THE TOKYO ZOOLOGICAL SOCIETY,
COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: \$6.00 per volume.

Journal of the Chemical
Society of Japan

(Japanese)

Annual Subscription: \$4.00

Bulletin of the Chemical
Society of Japan

(English, French or German)

Annual Subscription: \$2.00

PUBLISHED BY

THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN
c/o Faculty of Science, Tokyo Imperial University.

ACTA PHYTOCHIMICA

PUBLISHED BY

THE IWATA INSTITUTE OF PLANT BIOCHEMISTRY.

Subscription Price: \$5.00 per volume.

(Remittance should be sent to Maruzen & Co. Ltd.,
14 Tori Sanchoe, Nihonbashi, Tokyo)

第498號東京府規格外許可

外字生化學雜誌第三十三卷第一號

東京市牛込區市谷加賀町一丁目十一番地
發行所 柿 内 三 郎

東京市神田區美土代町十六番地
印刷者 島 連 太 郎

昭和十六年一月二十五日印刷 (定価第一卷)
昭和十六年一月二十八日發行 (内地金拾円)
東京市神田區美土代町十六番地
印刷所 三 秀 舍

